

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion der  
Plasminogen-bindenden  
 $\alpha$ -Enolase aus *Streptococcus pneumoniae*  
und der  
Tubulin-Tyrosin Ligase aus *Sus scrofa***

**Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. Nat.)**

**genehmigte  
Dissertation**

**von  
Stefanie Ehinger  
aus Wolfsburg**

1. Referent:.....Prof. Dr. Dirk W. Heinz  
2. Referentin:.....Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch  
eingereicht am:.....1. März 2004  
mündliche Prüfung (Disputation) am:.....27. Mai 2004

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. Dr. Dirk Heinz, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge:**

Stefanie Ehinger, Wolf-Dieter Schubert, Simone Bergmann, Sven Hammerschmidt, Dirk Heinz:

**Crystal Structure of a surface displayed  $\alpha$ -Enolase from *Streptococcus pneumoniae* – a plasminogen binding protein** (Vortrag)

5<sup>th</sup> Heart of Europe bio-Crystallography Meeting. Goslar, Deutschland (2002)

Stefanie Ehinger, Christian Erck, Jürgen Wehland, Dirk Heinz:

**Purification and Crystallization of porcine Tubulin-Tyrosine Ligase** (Vortrag)

4<sup>th</sup> Heart of Europe bio-Crystallography Meeting. Bedrichov, Tschechien (2001)

# Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI

## 1. Einleitung

<b>1.1 Die <math>\alpha</math>-Enolase aus <i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	1
1.1.1 Struktur und Multifunktionalität der $\alpha$ -Enolase	1
1.1.2 Die $\alpha$ -Enolase aus <i>S. pneumoniae</i> - ein Plasminogen-bindendes Glykolyseenzym	2
1.1.3 Struktur und Funktion des humanen $\alpha$ -Enolase-Rezeptors Plasminogen	4
1.1.4 Plasmin-induzierte Proteolyse unter physiologischen und pathologischen Bedingungen	6
1.1.5 Ziel der Arbeit	7
<b>1.2 Die Tubulin-Tyrosin Ligase aus <i>Sus scrofa</i></b>	9
1.2.1 Die Tubulin-Tyrosin Ligase	9
1.2.2 Posttranslationale Modifikationen von $\alpha/\beta$ -Tubulin	11
1.2.3 Funktion und Struktur von $\alpha/\beta$ -Tubulin	12
1.2.4 Ziel der Arbeit	16

## 2. Material und Methoden

<b>2.1 Chemikalien und Enzyme</b>	17
<b>2.2 Antikörper</b>	17
<b>2.3 Bakterienstämme</b>	18
<b>2.4 Hefestämme</b>	18
<b>2.5 Insektenzellenstämme</b>	18
<b>2.6 Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide</b>	18
2.6.1 Vektoren und Plasmide	18
2.6.2 Oligonukleotide	20
<b>2.7 Standards</b>	22
2.7.1 DNA-Größenstandards	22
2.7.2 Molekulargewichtsmarker	22
<b>2.8 Mikrobiologische Methoden</b>	23
2.8.1 Kulturmedien und Antibiotika	23
2.8.2 Kultivierung, Anzucht und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	24
2.8.3 Kultivierung, Anzucht und Stammhaltung von <i>Pichia pastoris</i>	25
2.8.4 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	25
<b>2.9 Biochemische Methoden</b>	
2.9.1 Herstellung von <i>E. coli</i> -Gesamtzellaufschlüssen und Zellextrakten	26
2.9.2 Isolierung und Reinigung von GST-Fusionsproteinen	27
2.9.3 Isolierung und Reinigung von His <sub>6</sub> -Fusionsproteinen	27
2.9.4 Produktion und Reinigung von monoklonalen Antikörpern	28



2.9.5	Herstellung von Fab-Fragmenten aus monoklonalen Antikörpern	28
2.9.6	Isolierung von $\alpha/\beta$ -Tubulin aus Rinderhirn	28
2.9.7	Chromatographische Methoden	30
2.9.8	Dialyse	31
2.9.9	Konzentrierung von Proteinen in Lösung	32
2.9.10	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.9.11	Proteintransfer auf Membranen ( <i>Blotting</i> )	33
2.9.12	Immunologischer Nachweis von Proteinen	33
2.9.13	Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen	34
2.9.14	N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen	34
2.9.15	Enzymatische Methoden	34
<b>2.10 Molekularbiologische Methoden</b>		
2.10.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
2.10.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.10.3	Ortsspezifische Mutagenese ( <i>site-directed mutagenesis</i> )	36
2.10.4	Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	36
2.10.5	Enzymatische <i>in-vitro</i> -Reaktionen an DNA	37
<b>2.11 Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen</b>		
2.11.1	Oberflächen-Plasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR; BIAcore)	37
2.11.2	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	39
<b>2.12 1D-<sup>1</sup>H-NMR</b>		41
<b>2.13 Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse</b>		
2.13.1	Kristallisation von Proteinen	43
2.13.2	Kristalle, Kristallstrukturanalyse und Datensammlung	46
2.13.3	Kryokristallographie	48
2.13.4	Bestimmung der Raumstruktur	49
<b>3. Ergebnisse</b>		
<b>3.1 Die <math>\alpha</math>-Enolase aus <i>Streptococcus pneumoniae</i> als Plasminogen-Bindeprotein</b>		
3.1.1	Produktion und Reinigung der $\alpha$ -Enolase	52
3.1.2	Bestimmung der Quartärstruktur der $\alpha$ -Enolase mittels analytischer Gelpermeationschromatographie (GPC)	54
3.1.3	Kristallisation der $\alpha$ -Enolase	55
3.1.4	Datensammlung und –prozessierung	55
3.1.5	Strukturlösung durch Molekularen Ersatz (MR)	57
3.1.6	Verfeinerung	58
3.1.7	Die Struktur der $\alpha$ -Enolase	58
3.1.8	Das $\alpha$ -Enolase Oktamer	62
3.1.9	Räumliche Lokalisation der Plasminogen-Bindestellen	64
3.1.10	Interaktionsanalysen der $\alpha$ -Enolase mit verschiedenen Plasminogenteilfragmenten im Vergleich mit vollständigem Plasminogen	65
3.1.11	Kokristallisationsversuche der $\alpha$ -Enolase mit Plasminogen	73

**3.2 Tubulin-Tyrosin Ligase: Untersuchungen zur Struktur und Funktion**

3.2.1	Produktion, Reinigung und Untersuchungen zum proteolytischen Abbau der Wildtyp-TTL_____	74
3.2.2	Kokristallisation von TTL-Mutanten mit ADP und Röntgenkristallographische Analysen_____	77
3.2.3	Aktivität von Cystein-Mutanten_____	84
3.2.4	Stabilisierung und Kokristallisationsversuche der Mutante TTL19 im Komplex mit Fab-Fragmenten_____	85
3.2.5	Kokristallisationsversuche der Mutante TTL19 mit C-terminalen Peptiden von $\alpha$ -Tubulin_____	88
3.2.6	Bindungsstudien und Kokristallisation der Mutante TTL19 mit $\alpha/\beta$ -Tubulin_____	89

**4. Diskussion**

<b>4.1 Die <math>\alpha</math>-Enolase aus <i>Streptococcus pneumoniae</i></b> _____	96
4.1.1 Die $\alpha$ -Enolase – ein „moonlighting“-Enzym_____	96
4.1.2 Die Struktur der $\alpha$ -Enolase aus <i>Streptococcus pneumoniae</i> _____	97
4.1.3 Die Plasminogenbindestellen der $\alpha$ -Enolase _____	99
4.1.4 Lysinbindungsstellen und Mechanismus der Bindung von humanem Plasminogen_____	102
4.1.5 Untersuchungen zur $\alpha$ -Enolase/Plasminogen-Interaktion_____	103
4.1.6 Ein Modell für die $\alpha$ -Enolase/Plasminogen-Interaktion_____	105
<b>4.2 Die Tubulin-Tyrosin Ligase aus <i>Sus scrofa</i></b> _____	107
4.2.1 Aktivität und Kristallisation von Cystein-Mutanten_____	107
4.2.2 Proteolytischer Abbau der TTL_____	109
4.2.3 Stabilisierung der Mutante TTL19 in Anwesenheit von Fab-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers ID3_____	111
4.2.4 Kokristallisationsversuche der Mutante TTL19 mit C-terminalen Peptiden von $\alpha$ -Tubulin und detyrosiniertem $\alpha/\beta$ -Tubulin_____	112

**5. Zusammenfassung**

<b>5.1 Die <math>\alpha</math>-Enolase aus <i>Streptococcus pneumoniae</i></b> _____	115
<b>5.2 Die Tubulin-Tyrosin Ligase aus <i>Sus scrofa</i></b> _____	116

<b>6. Literaturverzeichnis</b> _____	117
--------------------------------------	-----

<b>7. Danksagung</b> _____	128
----------------------------	-----

# Abkürzungsverzeichnis

$\Omega$	Ohm
$\epsilon_{280}$	Extinktionskoeffizient bei 280 nm
$\Delta 2$ -Tubulin	nicht tyrosinierbares Tubulin
$\mu\text{F}$	Mikrofarad
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
6-AHA	Aminohexansäure
$\text{\AA}$	Angström
$A_{280}$	Absorption bei 280 nm
$A_{600}$	Absorption bei 600 nm
ADP	Adenosindiphosphat
AH	Aminohexyl
AMP-PNP	5'-Adenylyl- $\beta$ , $\gamma$ -imidodiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
CAPS	3-(cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CCD	<i>charged- coupled device</i>
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CM	carboxymethyliert
$\text{CO}_2$	Kohlendioxid
CPA	Carboxypeptidase A
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskop
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et altera</i> )
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystalline</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase

GDP	Guanosindiphosphat
Glu-Plg	humanes Plasminogen ab AS 1
Glu-Pm	Plasmin ab AS 1
Glu-Tubulin	detyrosiniertes Tubulin
GPC	Gelpermeationschromatographie
GS	Glutathion-Sepharose
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
His <sub>6</sub>	sechs konsekutive Histidin-Reste
hPlg	humanes Plasminogen
IAA	Iodacetamid
IEC	Ionenaustauschchromatographie ( <i>ionic exchange chromatography</i> )
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
K	Kelvin
K1, K2, K3, K4, K5	Kringel Domänen 1, 2, 3, 4, 5 des humanen Plasminogen
K1-3	Kringel 1-3
K1-4	Kringel 1-4
K1-5	Kringel 1-5
kb	Kilobase
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K <sub>M</sub>	Michelis-Konstante
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanin
Lys-Plg	humanes Plasminogen ab AS 77
Lys-Pm	Plasmin ab AS 77
M	Mol
mA	Milliampère
MAD	Multiple anormale Dispersion
MAPs	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
mCi	Millicurie
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute(n)
MIR	Multipler Isomorpher Ersatz
mL	Milliliter
mM	Millimol
MME	Monomethylether
MPD	(±)-2-Methyl-2,4-pentandiol
M <sub>r</sub>	relatives Molekulargewicht
MR	Molekularer Ersatz ( <i>molecular replacement</i> )
MT	Mikrotubuli
MTOC	<i>microtubule organizing centres</i>
MW	Molekulargewicht

MWCO	Molekulargewicht-Ausschlussgrenze ( <i>molecular weight cut-off</i> )
NEM	N-Ethyl-Maleinimid
ng	Nanogramm
<i>nicked</i>	gespalten
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure-Agarose
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
NTP	N-terminales Peptid des humanen Plasminogens
<i>p.a.</i>	Reinheitsgrad von Chemikalien ( <i>pro analysis</i> )
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PC	Phosphocellulose
PCR	Polymereasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEM	Pipes-EGTA-Magnesium
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGA	2-Phospho-D-glycerinsäure
Pipes	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
Plg	Plasminogen
Pm	Plasmin
pmol	Pikomol
ppm	parts per million
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanzeinheiten ( <i>resonance units</i> )
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SEN	<i>streptococcal surface enolase</i>
SIRAS	<i>single isomorphous replacement with anomalous signal</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie ( <i>surface plasmon resonance</i> )
TAE	Tris-Actetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	Triosephosphatisomerase
TIR	Totale Interne Reflektion
t-PA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTCP	Tubulin-Tyrosin Carboxypeptidase
TTL	Tubulin-Tyrosin Ligase
Tyr-Tubulin	tyrosiniertes Tubulin

---

U	Internationale Einheit der Enzymaktivität ( <i>unit</i> )
ü.N.	über Nacht
u-PA	Urokinase-Plasminogenaktivator
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
$V_0$	Ausschlussvolumen
$V_e$	Elutionsvolumen
$V_M$	Matthews-Koeffizient (spezifische Kristalldichte)
$V_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

## 1.1 Die $\alpha$ -Enolase aus *Streptococcus pneumoniae*

### 1.1.1 Struktur und Multifunktionalität der $\alpha$ -Enolase

$\alpha$ -Enolasen (Phosphopyruvathydratasen, EC 4.2.1.11) wurden erstmals 1934 von Lohmann und Meyerhof beschrieben (Lohmann & Meyerhof, 1934). Diese Klasse der Metallionen-aktivierten Enzyme katalysiert im Zytoplasma die Dehydrierung von 2-Phosphoglycerat (PGA) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) in katabolischer Richtung im Rahmen der Glykolyse.

Eukaryontische  $\alpha$ -Enolasen sind stets Homodimere. Auch bei der  $\alpha$ -Enolase aus *E. coli* handelt es sich um ein solches Dimer (Kühnel & Luisi, 2000). Eubakterielle  $\alpha$ -Enolasen, z.B. aus *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis* und *Streptococcus mutans*, weisen dagegen oktamere Quartärstrukturen auf (Brown *et al.*, 1998).

$\alpha$ -Enolasemonomere bestehen aus zwei Domänen. Die kleinere N-terminale Domäne ist durch ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt mit kurzen Schlaufen geprägt, auf das vier  $\alpha$ -Helices folgen. Bei der zentralen C-terminalen Domäne handelt es sich um ein sogenanntes TIM-Barrel, das normalerweise durch acht parallel verlaufende, fass-ähnliche  $\beta$ -Stränge ausgebildet wird, die von acht  $\alpha$ -Helices umgeben sind.

Die Topologie der C-terminalen  $\alpha$ -Enolase-Domäne weicht von der anderer TIM-Barrel-Strukturen ab. Bei idealen TIM-Barrels kommt die Fass-Struktur durch abwechselnde parallele  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge zustande ( $(\beta\alpha)_8$ -Topologie). Bei  $\alpha$ -Enolasen sind die erste  $\alpha$ -Helix und der zweite  $\beta$ -Strang in der Reihenfolge vertauscht, was dazu führt, dass beide antiparallel zu den verwandten Sekundärstrukturelementen angeordnet sind. Die Topologie lässt sich als  $\beta\beta\alpha\alpha(\beta\alpha)_6$ -Topologie beschreiben (Kühnel & Luisi, 2001).

Das aktive Zentrum des Glykolyseenzym befindet sich am Ende der  $\beta$ -Stränge der C-terminalen Barrel-Domäne und katalytisch aktive Aminosäuren sind hoch konserviert.  $\alpha$ -Enolasen katalysieren schrittweise die Dehydrierung von 2-Phosphoglycerat (PGA) durch eine *anti*- $\beta$ -Eliminierung. Zunächst entzieht eine Base ein Proton vom C2-Atom des PGA, welches ein Carbanion bildet. Im zweiten Schritt der Katalyse wird eine Hydroxylgruppe des C3-Atoms durch eine Säure eliminiert. Hierzu wurden ein Lysin (Hefe: Lys345; *E. coli*: Lys341) und ein Glutamat (Hefe: Glu211; *E. coli*: Glu208) als katalytisches Säure-Base-Paar vorgeschlagen (Larsen *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1996). Ein alternatives Modell ist, dass ein Proton zwischen Glu211 (Hefe) und Glu168 wechselt und beide für die Eliminierung verantwortlich sein könnten (Zhang *et al.*, 1997). Für die katalytische Reaktion werden zwei  $Mg^{2+}$ -Ionen benötigt, wobei das zweite  $Mg^{2+}$ -Ion erst bindet, wenn das Substrat gebunden wurde und somit eine geringere Affinität besitzt als das zuerst gebundene  $Mg^{2+}$ -Ion. Dabei wird das erste  $Mg^{2+}$ -Ion von den drei konservierten Aminosäuren Asp246, Glu295 und Asp320 (Hefe) gebunden (Lebioda *et al.*, 1991; Wedekind *et al.*, 1995).

Je nach Zelltyp und Organismus wurden der  $\alpha$ -Enolase, neben ihrer eigentlichen glykolytischen Aufgabe, neue Eigenschaften und Funktionen zugeordnet, die eine Beteiligung an verschiedenen pathophysiologischen Prozessen einschließen (Pancholi, 2001). So steht die erhöhte Expression humaner  $\alpha$ -Enolasen beispielsweise in direkter Korrelation zur Entwicklung von neuroendokrinen Tumoren, Neuroblastom- und Lungentumoren (Kato *et al.*, 1983; Royds *et al.*, 1982; Niklinski & Furman, 1995; Cooper, 1994).  $\alpha$ -Enolase-Antikörper können verschiedene Autoimmunkrankheiten auslösen und sind an der Entwicklung systemischer rheumatischer Erkrankungen beteiligt (Pratesi *et al.*, 2000). Darüber hinaus beeinflussen  $\alpha$ -Enolasen die Mikrotubuliorganisation der Zellen durch Interaktion mit den Zentrosomen (Rattner *et al.*, 1991) und wurden außerdem als starkes Inhalationsallergen einiger Pilzarten identifiziert (Baldo & Baker, 1988; Ito *et al.*, 1995).

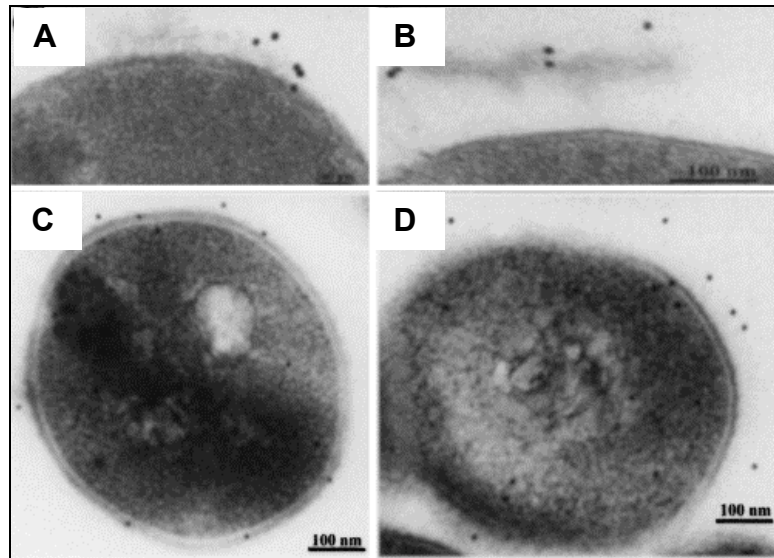
Auf Grund ihrer Multifunktionalität zeichnen sich  $\alpha$ -Enolasen ebenfalls als essentielle Elemente unterschiedlicher Überlebensstrategien pathogener Mikroorganismen aus (Lätheenmaki *et al.*, 2001). Neben anderen glykolytischen Enzymen, wie die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) und die Phosphofruktokinase, wird die  $\alpha$ -Enolase nicht nur im Zellinneren sondern auch auf der Zelloberfläche exprimiert. Oberflächenlokalisierte  $\alpha$ -Enolasen wurden z.B. bei einigen gram-positiven Kokken (Pancholi, 2001), *Candida albicans* (Angiolella *et al.*, 1996) und verschiedenen Parasiten, aber auch bei verschiedenen eukaryontischen Zellen wie Monozyten, T- und B-Zellen, neuronalen Zellen und Endothelzellen nachgewiesen (Miles *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1994; Dudani *et al.*, 1993; Redlitz *et al.*, 1995). Die Mechanismen zur Sekretion und Zellwandverankerung der  $\alpha$ -Enolasen sind noch nicht aufgeklärt.

Die Identifizierung der  $\alpha$ -Enolase auf der Zelloberfläche gram-positiver Mikroorganismen erfolgte erstmals für *Streptococcus pyogenes* (Pancholi & Fischetti, 1997). Die oberflächenlokalisierte  $\alpha$ -Enolase (SEN, *streptococcal surface enolase*) bindet humanes Plasminogen, das Zymogen der Serin-Protease Plasmin, und steht als Virulenzfaktor im direkten Zusammenhang mit der Pathogenese dieser Mikroorganismen.

### **1.1.2 Die $\alpha$ -Enolase aus *Streptococcus pneumoniae*- ein Plasminogen-bindendes Glykolyseenzym**

Auch das ubiquitäre, gram-positive humanpathogene Kokkenbakterium *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) produziert eine  $\alpha$ -Enolase, die sowohl im Zytoplasma als Glykolyseenzym, als auch auf der Zelloberfläche als Rezeptor für das humane Plasminogen bzw. Plasmin fungiert (Bergmann *et al.*, 2001; 2003; Abb. 1.1). Die  $\alpha$ -Enolase zeigt eine 93 %ige Identität zur Plasminogen-bindenden SEN aus *S. pyogenes* (Pancholi & Fischetti, 1998; ).





**Abb. 1.1:** Elektronenmikroskopische Darstellung zum Nachweis der Plasminogenbindung (A und B) und Lokalisation der  $\alpha$ -Enolase in verschiedenen Kompartimenten (C und D) von *S. pneumoniae* R6x (unkapseltes Isolat, A und C) und des Serotyps 2-Stammes, ATCC11733 (bekapselt, B und D) in Ultradünnschnitten (aus Bergmann *et al.*, 2001).

Pneumokokken gehören einerseits als Kommensalen zur natürlichen Flora des oberen Respirationstraktes und können auch aus dem Ohr, der Lunge oder sogar aus dem Blut gesunder Menschen ohne Krankheitssymptome isoliert werden (Austrian *et al.*, 1986). Andererseits sind Pneumokokken die Hauptverursacher von Lungenentzündungen und bakterieller Meningitis (Burman *et al.*, 1985).

Der Verlauf einer Pneumokokken-Infektion beginnt mit der Kolonisierung der Bakterienzellen an die mukosalen Zelloberflächen und der Anheftung an Epithelzellen des oberen Respirationstraktes des Wirts (Finlay & Falkow, 1997). Die Anheftung wird über verschiedene Rezeptoren vermittelt, die z. B. Kohlenhydrate eukaryontischer Zellen binden (Tuomanen & Masure, 1997). Nach der Besiedlung der Nasenhöhlen und -nebenhöhlen, die oftmals zur Nasennebenhöhlenentzündung (*Sinusitis*) führt, können die Pneumokokken über die Eustachische Röhre ins Mittelohr gelangen und dort eine Mittelohrentzündung (*Otitis media*) auslösen. Darüber hinaus können sie durch Aspiration in den Alveolraum gelangen und eine Lungenentzündung verursachen. Werden solche Lokalinfektionen nicht behandelt, können außerdem invasive Erkrankungen entstehen, die in diesen Fällen bakteriämisch verlaufen. Im bakteriämischen Stadium der Infektion sind Pneumokokken in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, in die Meningen (Hirnhäute) einzudringen und diese zu infizieren. Als weitere Folge kann es in seltenen Fällen nach Infiltration in den Blutstrom auch zur septischen Ausbreitung in die übrigen Körperorgane kommen (Musher, 1992).

Der derzeitige Kenntnisstand über die am Infektionsverlauf beteiligten Adhäsions- und Invasionsmechanismen der Pneumokokken und die involvierten Rezeptoren humaner Zelloberflächen ist gering. Zahlreiche Untersuchungen zeigten jedoch, dass neben der direkten Anheftungen an Epithelzellen auch direkte Interaktionen mit Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM)

stattfinden, die eine direkte Interaktion mit dem Serumprotein Plasminogen einschließen (Preissner & Chhatwal, 1999).

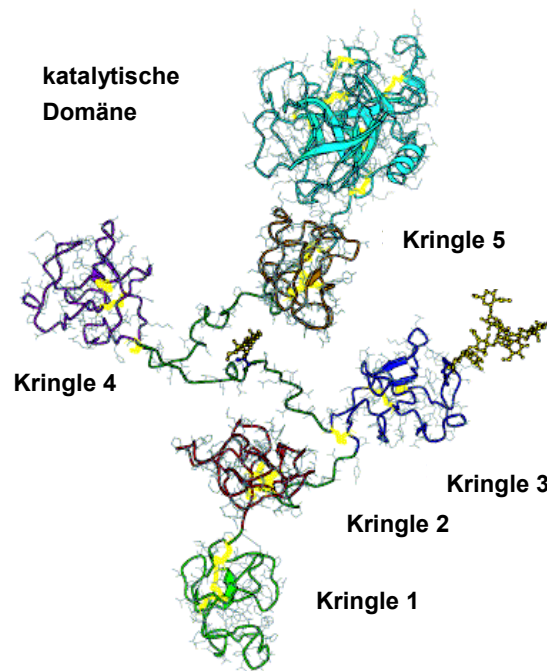
Die Wechselwirkung pathogener Mikroorganismen mit dem Zymogen Plasminogen und eine nachfolgende Prozessierung zur Serin-Protease Plasmin führt zu einem Angriff von Komponenten der ECM und Basalmembranen und ermöglicht auf diese Weise eine gesteigerte Ausbreitung im Wirt (Ring & Tuomanen, 2000, Übersichtsartikel).

Die Bindung der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* an Plasminogen wird über zwei voneinander unabhängige Bindungs epitope der  $\alpha$ -Enolase vermittelt. Die Interaktion mit Plasminogen findet zum einen mit den C-terminalen Lysinen und zum anderen mit einem internen Bindungs epitop, dass die Aminosäuren 248-256 umfasst, statt (Bergmann *et al.*, 2003). Bisher ist jedoch nicht genau bekannt, welche Domänen des Plasminogens an der Bindung der  $\alpha$ -Enolase beteiligt sind. Hydrophobizitätsanalysen zur Darstellung der Oberflächenlokalisation einzelner Aminosäurebereiche der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* gaben bereits deutliche Hinweise, dass sich die C-terminalen Lysine und das interne Bindungs epitop mit hoher Wahrscheinlichkeit an nach außen exponierten Positionen des Moleküls befinden und somit gut zugänglich für Plasminogen sind.

### 1.1.3 Struktur und Funktion des humanen $\alpha$ -Enolase-Rezeptors Plasminogen

Das humane Glykoprotein Plasminogen ist ein monomeres Serumprotein (92 kDa; 791 AS), das unter anderem in den Nieren gebildet wird (Highsmith *et al.*, 1971). Humanes Plasminogen gehört zur Familie der  $\beta$ -Globuline und liegt unter physiologischen Bedingungen mono- oder diglykosyliert vor (Van den Steen *et al.*, 2001). Plasmin, das durch Aktivierung von Plasminogen entstehende serin-proteolytische Enzym, ist zur Hydrolyse von Peptiden, L-Arginin, L-Lysinestern und zum Abbau von Fibrin(gerinnseln) befähigt. Aktives Plasmin hydrolysiert weiterhin verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix wie Vitronektin und Laminin, und aktiviert darüber hinaus weitere Proteasen, wie Kollagenasen. Die Induktion der proteolytischen Gewebedegradation durch Aktivierung des Plasminogens auf Zelloberflächen hat signifikante Auswirkungen auf Wundheilungsprozesse, Gewebeerneuerungsprozesse, Embryogenese und der Ausbreitung und Metastasierung von Tumorzellen (Plow *et al.*, 1995).

Strukturell besitzt Plasminogen sieben voneinander unabhängige Domänen (Abb.1.2). Auf ein N-terminales Peptid ohne bekannte Sekundärstruktur (5 kDa, AS 1-77) folgen fünf Kringle-Domänen, in denen Lysinbindungsstellen vorhanden sind (K1-5, AS 83-540), und eine C-terminale, Trypsin-ähnliche katalytische Domäne (AS 561-791).



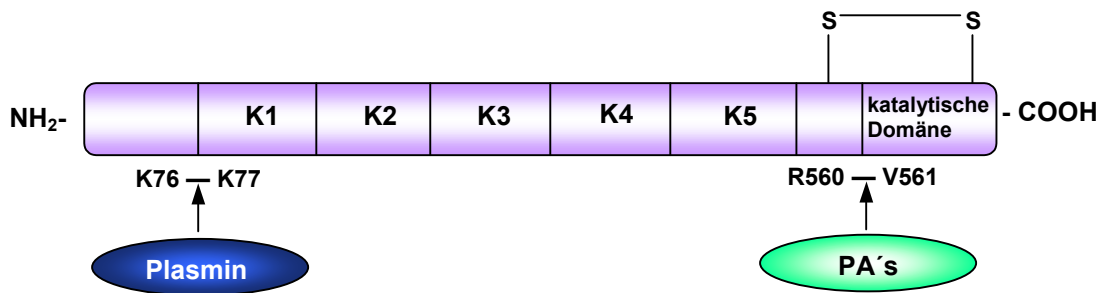
**Abb. 1.2: Strukturmodell des humanen Plasminogens**

Strukturmodell basierend auf der NMR-Struktur von Kringle 2 (PDB 1B2I; rot) und den Kristallstrukturen von Kringle 1 (PDB 1PKR; grün), Kringle 4 (PDB 1KRN, lila), Kringle 5 (PDB 5HPG, orange) und der katalytischen Domäne (PDB 1DDJ, hellblau). Das Modell des dritten Kringle (blau) basiert auf der Struktur von Kringle 1. Die Linker zwischen den Domänen werden als Schleifen ohne Sekundärstruktur dargestellt. Zwei Glykosylierungen befinden sich an den AS-Resten 308 und 365 (SWISSPROT Nummerierung). Disulfidbrücken sind gelb und Zuckerreste sind in gelb-braun dargestellt. Die Struktur des N-terminalen Peptids ist bisher nicht gelöst (aus Van den Steen *et al.*, 2001).

Die Kringle-Domänen vermitteln die Bindung unterschiedlicher Liganden an Plasminogen, wie Fibrin und den Plasminogen-Regulatoren (Sottrup-Jensen *et al.* 1978). Kringle sind ca. 80 Aminosäuren umfassende Tertiärstrukturen, in denen Disulfidbrücken nach einem typischen Muster (C1-6, C2-4, C3-5) ausgebildet werden (Bürgin & Schaller, 1999). Sie sind ebenfalls in unterschiedlicher Anzahl in einigen Serumproteinen vorhanden, von denen mehrere als Fibrinolysefaktoren identifiziert wurden (Saskela & Rifkin, 1988). Wechselwirkungen zwischen Plasminogen und seinen Liganden erfolgen in der Regel über Lysinbindungsstellen der Kringle-Domänen und C-terminal exponierten bzw. intern gelegenen Lysin-Resten des Liganden (Miles *et al.*, 1991). Die Struktur der Lysinbindungsstellen besteht aus einem Dipol mit anionischen und kationischen Regionen, der von hydrophoben Bereichen aromatischer Aminosäuren umgeben ist (Tulinski, 1991).

Vollständiges, inaktives Plasminogen wird nach seiner N-terminalen Aminosäure Glutamat als Glu-Plasminogen (Glu-Plg) bezeichnet. Glu-Plasminogen weist eine geschlossene, spiralförmige Konformation auf, die auf Interaktionen zwischen den Lysinbindungsstellen und den Lysinen des N-terminalen Peptids zurückzuführen sind (Ponting *et al.*, 1992). Das Zymogen wird nach Bindung von Aktivatoren zur Serin-Protease Plasmin prozessiert. Wechselwirkungen zwischen physiologischen Substraten wie Fibrin und den multiplen Bindungsstellen im Glu-Plg führen zunächst zu einer offenen Konformation des Moleküls. Physiologische Aktivatoren (t-PA, *tissue type plasminogen activator*; u-PA, *urokinase-type plasminogen activator*) binden und katalysie-

ren die Peptidspaltung zwischen Arg560/Val561 unter Bildung von Glu-Plasmin (Glu-Pm). Glu-Pm besteht aus einer schweren Kette (65 kDa; AS 1-560) und einer Disulfid-verbrückten leichten Kette (25 kDa; AS 561-791; Abb.1.3). Es folgt eine autokatalytische Peptidspaltung zwischen Lys76/Lys77 unter Bildung von Lys-Plasmin (Lys-Pm). Bereits aktiviertes Lys-Pm spaltet weitere Moleküle Glu-Plg zwischen AS Lys76/Lys77 unter Bildung von Lys-Plg, welches wiederum durch Lys-Pm und Plasminogen-Aktivatoren (PA) aktiviert werden kann (Castellino & Powell, 1981).



**Abb. 1.3: Humanes Plasminogen**

Molekülstruktur des humanen Plasminogens mit den Kringle-Domänen 1-5, den Spaltstellen für Plasmin und Plasminogen-Aktivatoren t-PA bzw. u-PA (PA's).

#### 1.1.4 Plasmin-induzierte Proteolyse unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Der Plasmin-induzierte proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) ist ein allgemeiner Mechanismus, der für die Gesundheit und Krankheit des Menschen von entscheidender Bedeutung ist (Plow *et al.*, 1995).

Die ECM besteht unter anderem aus fibrillären und netzwerkbildenden Kollagenen. Die Kollagentypen I, II und III bauen als Faserbündel das Gerüst der ECM auf, während der nicht-fibrilläre Kollagentyp IV die Basalmembran (Membran an der basalen Seite epithelialer Zellen) gestaltet. Neben Kollagen besteht die Basalmembran vor allem aus Proteoglykanen, Fibronectin, Laminin und Entaktin. Die Verankerung einer Zelle an der Basalmembran erfolgt über Integrine, die als Hemidesmosomen oder fokale Adhäsionskontakte organisiert sind. Das Kollagennetzwerk der ECM durchspannt eine Gelmatrix, die aus unverzweigten Polysacchariden, den Glykosaminoglykanen, gebildet wird. Die ECM enthält darüber hinaus eine Vielzahl an Proteinen, die durch ihre adhäsiven Eigenschaften eine Interaktion zwischen Zelloberflächen und anderen Matrixkomponenten vermitteln.

Unter physiologischen Bedingungen hängt die Plasmin-induzierte Proteolyse der extrazellulären Matrix oder Basalmembranen mit der Zellmigration zusammen. Makrophagen und andere Zelltypen nutzen diesen Mechanismus für die Wanderung durch den Körper. Sie sezernieren Plasminogen-Aktivatoren, die lokal Plasminogen zu Plasmin aktivieren. Dieser Mechanismus ist besonders wirksam bei hohen Konzentrationen des Proenzym Plasminogen in Blut und Gewebe und stellt in Folge der Aktivierung ein großes Reservoir potentieller proteolytischer Aktivität dar. Die

aktive Form Plasmin wandelt Prokollagenasen in Kollagenasen um und aktiviert möglicherweise auch andere Enzyme, die zu einem lokalen Abbau der extrazellulären Matrix führen. Eine präzise Regulation des Mechanismus erfolgt durch sezernierte Hemmsubstanzen, den Plasmin-Inhibitoren wie z.B.  $\alpha_2$ -Antiplasmin. Die proteolytische Wirkung von Plasmin steht auch mit der zunehmenden Gefäßpermeabilität im Zusammenhang. Dieser Effekt ermöglicht die Infiltration von Monozyten und anderen Blutzellen aus der Gefäßzirkulation in Gewebebereiche erhöhten Bedarfs, die z.B. zur Gewebebildung und Reorganisation führen (Plow *et al.*, 1991, 1995; Saksela & Rifkin, 1988).

Der Plasmin-induzierte Gewebeabbau trägt aber auch zum Fortschreiten vieler Erkrankungen bei, da ähnliche Mechanismen ebenfalls von pathogenen Erregern benutzt werden. Ebenso wie für Zellen mit maligner Umwandlung wurde für pathogene Erreger sowohl eine Sekretion von Plasminogen-Aktivatoren, als auch eine Expression von Plasminogen-bindenden Proteinen auf Zelloberflächen, festgestellt. Mit der Bindung von Plasminogen an ihre Oberflächen wird das Zymogen entweder durch physiologische oder nicht-physiologische Plasminogen-Aktivatoren aktiviert. Plasmin induziert die Degradation der ECM, wodurch die Permeabilität der lokalen Blutgefäße erhöht und die systematische Ausbreitung der Infektion gefördert wird (Lottenberg, 1997; Lähdenmäki *et al.*, 2001).

Das humanpathogene Bakterium *Streptococcus pyogenes* ist in der Lage Plasminogen durch den nicht-physiologischen Aktivator Streptokinase zu aktivieren. (Lottenberg *et al.*, 1992). Die Interaktion der Streptokinase mit Plasminogen erfolgt direkt im Bereich der serinproteolytischen Enzymdomäne (Ponting *et al.*, 1992). Pneumokokken produzieren keine eigenen Plasminogen-Aktivatoren und nutzen die oberflächenlokalisierte  $\alpha$ -Enolase um Plasminogen zu binden. Versuche mit künstlichen Basalmembranen haben gezeigt, dass die Bindung von Plasminogen an Pneumokokken und die anschließende Aktivierung zum serinproteolytischen Enzym nur in Anwesenheit physiologischer Plasminogen-Aktivatoren zu einer gezielten Degradation der Matrix führt (Eberhard *et al.*, 1999). Weitere Untersuchungen zeigten, dass zur Plasminogenaktivierung in Anwesenheit der  $\alpha$ -Enolase ebenfalls ein physiologischer Plasminogen-Aktivator notwendig ist und bestätigten vorherige Beobachtungen (Bergmann, 2003).

Die Bindung von Plasminogen an die  $\alpha$ -Enolase ermöglicht vermutlich eine Öffnung des kompakten Plasminogens auf der Zelloberfläche. Die offene Plasminogen-Konformation im Komplex mit der  $\alpha$ -Enolase beschleunigt möglicherweise die anschließende Aktivierung zum Plasmin und ermöglicht eine leichtere Überwindung der physischen Barriere.

### 1.1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Plasminogen-bindende  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* zu kristallisieren, ihre Raumstruktur zu lösen und die auf Aminosäuresequenzebene identifizierten Plasminogen-Bindungsstellen zu lokalisieren. Der Vergleich dieser  $\alpha$ -Enolase mit  $\alpha$ -Enolasen, die nicht mit Plasminogen wechselwirken, sollte Hinweise zur Plasminogen-Bindung geben.

Zu Beginn dieses Projekts war noch nicht bekannt, welche Kringle-Domäne/n die Bindung an die  $\alpha$ -Enolase vermitteln. Daher sollte unter Verwendung verschiedener Plasminogenteilfragmente (Kringle 1-3, 1-4 und 1-5) die Plasminogen-Bindung näher charakterisiert und auf bindende Domänen eingegrenzt werden. Dafür sollten verschiedene Plasminogenteilfragmente heterolog in *Pichia pastoris* produziert und gereinigt werden.

Durch Kokristallisation der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* mit humanem Plasminogen sollte zudem der molekulare Interaktionsmechanismus beider Proteine im Detail untersucht werden.

## 1.2 Die Tubulin-Tyrosin-Ligase aus *Sus scrofa*

### 1.2.1 Die Tubulin-Tyrosin Ligase

Die zytosolische Tubulin-Tyrosin Ligase (TTL; EC 6.3.2.25) ist zusammen mit der Tubulin-Tyrosin Carboxypeptidase (TTCP) für die Tyrosinierung bzw. Detyrosinierung, eine posttranslationale Modifikation, des wichtigen Zytoskelettproteins  $\alpha/\beta$ -Tubulin verantwortlich.

Die TTL ist eine Peptidligase, die unabhängig von einer tRNA ein L-Tyrosin an den C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin anfügt (Murofushi, 1980). Das C-terminale Tyrosin ist bei den meisten  $\alpha$ -Tubulin-Isotypen durch die mRNA codiert. Voraussetzung für einen nicht-genetisch codierten Einbau von L-Tyrosin an den C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin ist die vorherige Abspaltung des L-Tyrosins. Die Entfernung der Aminosäure erfolgt durch die spezifische TTCP (Argarana *et al.*, 1978). Während die TTL nur das  $\alpha$ -Tubulin im löslichen  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimer tyrosiniert, bevorzugt die TTCP das bereits polymerisierte, stabile  $\alpha$ -Tubulin der Mikrotubuli (Kumar & Flavin, 1982). Beide Enzyme ergeben somit zusammen ein einzigartiges Enzymsystem, das in der Lage ist, reversibel und hochspezifisch ein Protein am C-Terminus zu modifizieren.

Die Tyrosinierung von  $\alpha$ -Tubulin und damit auch die TTL kommen in vielen Spezies vom Einzeller bis zum Menschen vor (Preston *et al.*, 1979; Sasse & Gull, 1988). Während einige Trichomonaden kein C-terminales Tyrosin am  $\alpha$ -Tubulin tragen und somit nicht am De-/Tyrosinierungs-Zyklus teilnehmen, wurde in Nematoden sowohl tyrosiniertes als auch detyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin gefunden (Schneider *et al.*, 1999; Mansir & Justine, 1998). Diese Modifikation ist außerdem in Pflanzenzellen zu finden (Wehland *et al.*, 1984). Hefezellen (*S. pombe*) und Kieselalgen (*Thalassiosira fluviatilis*) besitzen beide ein C-terminales Tyrosin, jedoch kein nachweisbares detyrosiniertes Tubulin und nehmen daher nicht am Tyrosinierungs-Zyklus teil (Alfa & Hyams, 1991; Machell *et al.*, 1995).

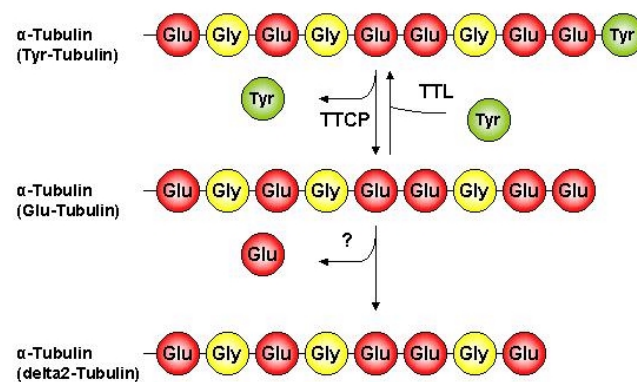
Die TTL bildet einen 1:1-Komplex mit seinem löslichen  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Substrat (Raybin & Flavin, 1977; Schröder *et al.*, 1985). Die Wechselwirkung erfolgt sowohl mit  $\alpha$ - als auch mit  $\beta$ -Tubulin, wodurch sich die Substratspezifität der TTL erhöht (Wehland & Weber, 1987a).

Limitierte Proteolysestudien unter Verwendung der Endoproteinase GluC (V8-Protease) zeigten, dass die TTL in zwei stabile Fragmente, ein N-terminales (30 kDa) und ein C-terminales (14 kDa), gespalten wird (Wehland & Weber, 1987a). Die Spaltstelle liegt zwischen Glu248 und Tyr249. Die resultierenden Spaltfragmente können nicht voneinander getrennt werden und bleiben weiterhin eng assoziiert. Man spricht dann von „nicked“ TTL, die interessanterweise keine katalytische Aktivität mehr aufweist (Wehland & Weber, 1987a).

Immunochemische Untersuchungen zeigten, dass das 30 kDa-Fragment eine Bindungsstelle sowohl für  $\beta$ -Tubulin, als auch für ATP besitzt. Die Bindung eines zweiten Antikörpers, der das 14 kDa-Fragment erkennt, hat eine inhibierende Wirkung auf die katalytische Aktivität der TTL. Da die Komplexbildung nicht beeinträchtigt wird, geht man davon aus, dass einige Aminosäuren dieser Domäne einen Teil des katalytischen Zentrums repräsentieren (Wehland & Weber, 1987a).

Für die katalytische Reaktion benötigt die TTL ATP,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ -Ionen, sowie die Substrate L-Tyrosin und detyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin im Komplex mit  $\beta$ -Tubulin. Außer L-Tyrosin können L-Phenylalanin (Barra *et al.*, 1973), L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanin) (Arce *et al.*, 1975) und 3-Nitrotyrosin (Eiserich *et al.*, 1999; Kalisz *et al.*, 2000) als Substrate der TTL umgesetzt werden. In Anwesenheit von ADP und freiem Phosphat ( $P_i$ ) kann die Umkehrreaktion (Detyrosinierung) erfolgen, die jedoch mit nur 2% der spezifischen Aktivität sehr langsam abläuft (Raybin & Flavin, 1977; Rodriguez *et al.*, 1973).

Die Substraterkennung der TTL hängt entscheidend von der C-terminalen Sequenz des zuvor detyrosinierten  $\alpha$ -Tubulins ab. Umfasst der C-Terminus die Aminosäuresequenz Glu447-Gly448-Glu449-Glu450, erfolgt eine vollständige Tyrosinierung. Abweichungen führen zu einer unvollständigen Tyrosinierung oder verhindern sie ganz (Rüdiger *et al.*, 1994). Das freie carboxyterminale Glu450 (Position -1) des detyrosinierten  $\alpha$ -Tubulins (Glu-Tubulin) ist für die Tyrosinierungsreaktion zwingend erforderlich.  $\Delta 2$ -Tubulin, dem zusätzlich zum Tyr451 das vorangehende Glutamat fehlt, ist kein Substrat der TTL und wird somit nicht tyrosiniert (Abb.1.4).



**Abb. 1.4: De-/Tyrosinierungs-Zyklus am C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin**

Graphische Darstellung des De-/Tyrosinierungs-Zyklus des TTCP/TTL-Enzymsystems und Substratspezifität der TTL. Tyr-Tubulin = tyrosiniertes Tubulin, Glu-Tubulin = detyrosiniertes Tubulin,  $\Delta 2$ -Tubulin = Isoform des Glu-Tubulin dem Glu450 fehlt, TTCP = Tubulin-Tyrosin Carboxypeptidase, TTL = Tubulin-Tyrosin Ligase. Das Glu-Tubulin deglutamylierende Enzym ist nicht bekannt.

Untersuchungen mit Antikörpern, die tyrosiniertes bzw. detyrosiniertes  $\alpha$ -Tubulin erkennen, zeigten, dass der Tyrosinierungsgrad des Tubulins in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe stark variiert (Gundersen *et al.*, 1984). Zudem hängt der Tyrosinierungsgrad eng mit dem Entwicklungsstadium der Zellen zusammen. So enthalten stabile Mikrotubuli (MT) z.B. der Zentriolen und Nervenaxone vornehmlich detyrosiniertes Tubulin, während tyrosiniertes Tubulin eher in dynamischen MT vorkommt (Gundersen *et al.*, 1984; Wehland & Weber, 1987b). Dennoch ist auch hier zu beachten, dass detyrosiniertes Tubulin einen stabilen Mikrotubulus voraussetzt und nicht die Ursache der Stabilisierung ist (Wehland & Weber, 1987; Webster *et al.*, 1990; Khawaja *et al.*, 1988).

Untersuchungen zur TTL-Enzymaktivität mit synthetischen Peptiden, deren Sequenzen den carboxyterminalen Resten von  $\alpha$ -Tubulin entsprechen, zeigten, dass Peptide mit einer Mindestlänge



von 13 Aminosäuren von der TTL vollständig tyrosiniert werden (Rüdiger *et al.*, 1994). Im Vergleich zu detyrosiniertem  $\alpha/\beta$ -Tubulin erweisen sich die synthetischen Peptide jedoch als wesentlich ungünstigere Substrate, die bis zu 50-fach langsamer tyrosiniert werden.

Über den katalytischen Mechanismus der TTL liegen bisher keine detaillierten Studien vor. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Tyrosinierung über eine Phosphataktivierung des C-terminalen Glutamats unter ADP-Bildung initiiert wird (Galperin & Koonin, 1997), analog zu der gut charakterisierten Glutathion-Synthetase (Yamaguchi *et al.*, 1993). Es folgt ein nukleophiler Angriff der Aminofunktion des L-Tyrosins unter Bildung eines tetraedrischen Aminoacylphosphat-Intermediats, das rasch in Produkt und Phosphat zerfällt.

Die Glutathion-Synthetase gehört zur Familie der ADP-bildenden Synthetasen, die auch die Biotin-Carboxylase (Atrymiuk *et al.*, 1996) und die D-Alanin-D-Alanin-Ligase (Fan *et al.*, 1994) einschließt. Die Kristallstrukturen dieser Enzyme zeigen, dass trotz nicht erkennbarer Sequenzhomologie eine gemeinsame Faltung, der sogenannte „ATP-grasp-fold“, vorliegt und alle drei Enzyme eine ähnliche Struktur besitzen (Galperin & Koonin, 1997; Matsuda *et al.*, 1996). Unter Verwendung strukturbasierter Sequenzvergleiche und einer begrenzten Sequenzhomologie für die ATP-Bindungsstelle wurde für die TTL eine ähnliche Struktur postuliert (Galperin & Koonin, 1997; Dideberg & Bertrand, 1998).

Die TTL wurde ursprünglich zunächst in sehr geringen Mengen aus Schweinehirn isoliert (Raybin & Flavin, 1977; Schröder *et al.*, 1985). Die Präparationen gestalteten sich als besonders schwierig. Grund ist die Instabilität der TTL in Abwesenheit von  $\alpha/\beta$ -Tubulin und die gleichzeitige Tendenz mit  $\alpha/\beta$ -Tubulin einen Komplex zu bilden. Anfang der 90er Jahre gelang es die cDNA (1137 bp) der TTL aus dem Schwein (*Sus scrofa*) erstmals zu klonieren (Ersfeld *et al.*, 1993). Die komplette cDNA kodiert für 379 Aminosäuren der TTL mit einem Molekulargewicht von 43.4 kDa und einem berechneten isoelektrischen Punkt von 6.51. Die Klonierung der cDNA ermöglichte erstmals die rekombinante Herstellung großer Mengen der TTL in *E. coli* (Erck *et al.*, 2000).

Dass die TTL ein essentielles Enzym ist, zeigen „TTL-Knock-out-Mäuse“, deren homozygote Nachkommen unmittelbar nach der Geburt sterben (C. Erck, persönliche Mitteilung). Heterozygote Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen erhöhten Anteil an  $\Delta 2$ -Tubulin auf, das, wie beschrieben, als Tubulin-Isoform nicht von der TTL als Substrat erkannt werden kann. Das nicht-tyrosinierbare  $\Delta 2$ -Tubulin kommt in neuronalem Gewebe vor und ist dort in äußerst stabilen MT zu finden.

### 1.2.2 Posttranslationale Modifikationen von $\alpha/\beta$ -Tubulin

Posttranslationale Modifikationen, wie die Tyrosinierung bzw. Detyrosinierung, modulieren die Eigenschaften von  $\alpha/\beta$ -Tubulin, das darüber hinaus durch Expressionen genetisch codierter Isoformen und über Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) verändert wird (Wolff *et al.*, 1982). Zu den MAPs gehören Proteine mit rein struktureller Funktion (z.B. Tau-Protein, MAP 1 und 2) und

Motorproteine mit rein dynamischer Funktion (Kinesin und Dynein). Die MAPs interagieren vor allem mit den C-Termini der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin. Die posttranslationalen Modifikationen, die ebenfalls überwiegend an den C-terminalen Enden der  $\alpha/\beta$ -Tubuline stattfinden, umfassen neben der Detyrosinierung bzw. Tyrosinierung, auch die Phosphorylierung, die Palmitoylierung, die Polyglutamylierung und die Polyglycylierung (Übersichtsartikel MacRae, 1997; Westermann & Weber, 2003).

Bei der Polyglutamylierung werden ein bis sechs Glutamat-Reste irreversibel an ein C-terminales Glutamat von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tubulin angehängt. Diese Modifikation ist überwiegend in stabilen Mikrotubuli (MT) neuronaler Gewebe zu finden (Edde *et al.*, 1992). Die Polyglycylierung wiederum führt zur Verknüpfung von 3-34 Glycinen an die  $\gamma$ -Carboxylgruppe eines bestimmten Glutamat-Restes im C-terminalen Bereich der Tubuline (Redeker *et al.*, 1994). Polyglycyliertes Tubulin ist ebenfalls in stabilen MT nachweisbar.

Trotz ausführlicher Charakterisierungen der beschriebenen posttranslationalen Modifikationen ist die biologische Relevanz weitestgehend ungeklärt. Kürzlich konnte jedoch an dem Modellorganismus *Tetrahymena* gezeigt werden, dass die Polyglycylierung eine wichtige Modifikation darstellt (Xia *et al.*, 2000). *Tetrahymena*-Mutanten, deren Tubuline nicht vollständig oder gar nicht polyglycyliert werden, zeigten ein verlangsamtes Wachstum und wiesen Defekte in der Zytokinese auf. Zusätzlich wurde ein langsames Bewegungsvermögen der Cilien beobachtet. Die Polyglycylierung hat daher vermutlich einen Einfluss auf die Funktion ciliärer Dynein-Motoren (Rosenbaum, 2000).

Ob die De-/Tyrosinierung von  $\alpha$ -Tubulin einen ähnlichen Einfluss auf die Interaktionen mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) hat, ist bisher unbekannt. Studien an kultivierten Säugetierzellen zeigten, dass sich Intermediärfilamente vorzugsweise an Mikrotubuli ausrichten, die vornehmlich detyrosiniertes Tubulin (Glu-Tubulin) enthalten (Gurland & Gundersen, 1995). Die Überlegung, dass Glu-Tubulin die Bindung an Intermediärfilamente indirekt vermittelt, wurde mit Iodacetamid-behandeltem Glu-Tubulin (IAA-Glu-Tubulin), einer nicht-polymerisierbaren Form, gezeigt (Kreitzer *et al.*, 1999). Injiziertes IAA-Glu-Tubulin wirkt als Inhibitor, wodurch die Kolokalisation mit dem Intermediärfilament-Netzwerk letztendlich zusammenbricht. Umgekehrt lösen weder IAA-tyrosiniertes Tubulin bzw. unbehandeltes Glu-Tubulin einen vergleichbaren Zusammenbruch des Intermediärfilament-Netzwerks aus. Die Tubulin-De-/Tyrosinierung fungiert demnach möglicherweise als Signal, um Intermediärfilamente an MT zu rekrutieren (Kreitzer *et al.*, 1999).

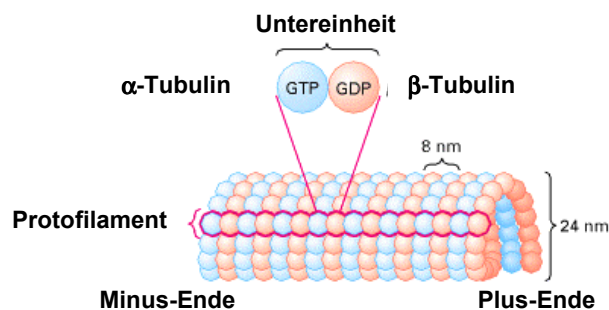
### 1.2.3 Funktion und Struktur von $\alpha/\beta$ -Tubulin

Das Substrat der TTL, das Heterodimer  $\alpha/\beta$ -Tubulin, ist der Baustein der Mikrotubuli. Mikrotubuli bilden zusammen mit den Intermediärfilamenten und Mikrofilamenten das Zytoskelett. Eine wichtige Aufgabe des Zytoskeletts ist der Erhalt der äußeren Zellform eukaryontischer Zellen. Darüber hinaus fungiert es auch als intrazelluläre Strukturkomponente des Zytoplasmas und nimmt zusätzlich viele dynamische Aufgaben wahr. So fordert die Zellteilung und

– differenzierung, die Kontaktaufnahme zu Nachbarzellen, sowie der intrazelluläre Stoff- und Organelltransport eine ständige Reorganisation des Zytoskeletts.

Mikrotubuli sind während der Zellteilung an der Ausbildung des Spindelapparates, sowie beim Aufbau und Struktur von Cilien/Flagellen, beteiligt. Mittels Motorproteinen dienen sie dem Vesikel- und Organelltransport innerhalb der Zelle als Leitelemente (Hyams & Lloyd, 1993).

Die aus  $\alpha/\beta$ -Tubulinen aufgebauten Mikrotubuli (MT) sind röhrenförmige Strukturen und bestehen typischerweise aus 13 parallel angeordneten Protofilamenten, welche die Wand des Mikrotubulus bilden. Die in den Protofilamenten angeordneten Heterodimere sind gegeneinander um einen bestimmten Betrag versetzt, wodurch eine helikale Anordnung der Tubulin-Moleküle zustande kommt (Amos & Baker, 1979; Mandelkow *et al.*, 1986; Abb. 1.5). Darüber hinaus wird durch die gleichsinnige Anordnung der Heterodimere in einem Protofilament eine Polarität des Mikrotubulus begründet, die eine wesentliche Ursache für sein dynamisches Verhalten ist.



**Abb. 1.5: Organisation der Tubulin-Untereinheiten in einem Mikrotubulus.**

$\alpha$ -Tubulin lagert sich stets an  $\beta$ -Tubulin an, wodurch ein Protofilament entsteht. Die laterale Zusammenlagerung der Protofilamente führt letztendlich zu der polaren Röhrenstruktur des Mikrotubulus.

Die Assemblierung löslicher  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere zu einem Mikrotubulus erfolgt durch „head-to-tail“-Polymerisation (Bergen & Borisy, 1980; Abb. 1.6 (1)). Jedoch binden ausschließlich GTP-aktivierte Heterodimere (GTP-Tubulin), bei welchen beide Untereinheiten GTP binden. Das GTP im  $\alpha$ -Tubulin ist stabil und wird nicht hydrolysiert. Das GTP im  $\beta$ -Tubulin hingegen wird in Folge der Polymerisation zu GDP hydrolysiert und kann dann ausgetauscht werden (MacNeal & Purich, 1978). Einzelne Protofilamente lagern sich zu einem röhrenförmigen MT zusammen (Abb. 1.6 (2)). Eine verzögerte GTP-Hydrolyse bewirkt das Wachstum der Mikrotubuli: Wenn schneller GTP-Tubulin nachgeliefert wird, als hydrolysiert werden kann, wächst der Mikrotubulus. Sobald instabiles GDP-Tubulin am Ende des MT vorliegt, depolymerisiert der Mikrotubulus. Das GTP-Tubulin (GTP-Kappe, „GTP-cap“) wirkt daher stabilisierend (Mitchison & Kirschner, 1984; Abb. 1.6 (3)).

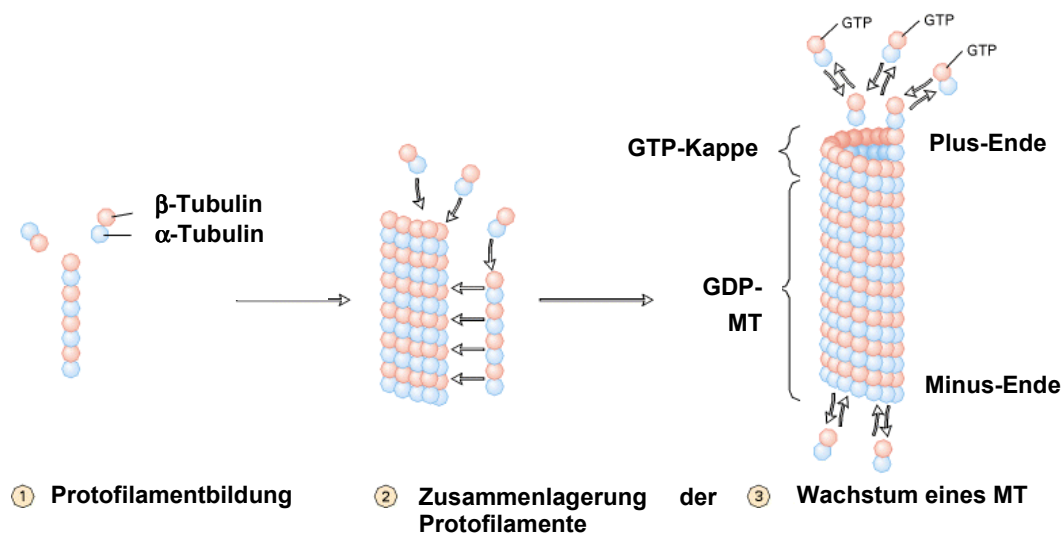


Abb. 1.6. Bildung und Wachstum eines Mikrotubulus

Das MT-Ende, an dem eine Netto-Anlagerung von GTP-Tubulin stattfindet, wird als Plus-Ende bezeichnet (Abb. 1.6 (3)). Das MT-Ende mit GDP-Tubulin unterliegt der Depolymerisation und wird als Minus-Ende bezeichnet. Sind Wachstum und Zerfall ausgeglichen, so stellt sich ein Fließgleichgewicht ein, das auch als „Tretmühlen-Mechanismus“ bezeichnet wird. Die Anzahl der assoziierten GTP-Tubulin-Heterodimere stimmt dann mit der Anzahl der dissoziierten, löslichen Dimere überein. Neu angefügte Untereinheiten wandern wie in einer Tretmühle durch das Filament bis zum Minus-Ende, wo sie sich wieder ablösen (Abb. 1.7).

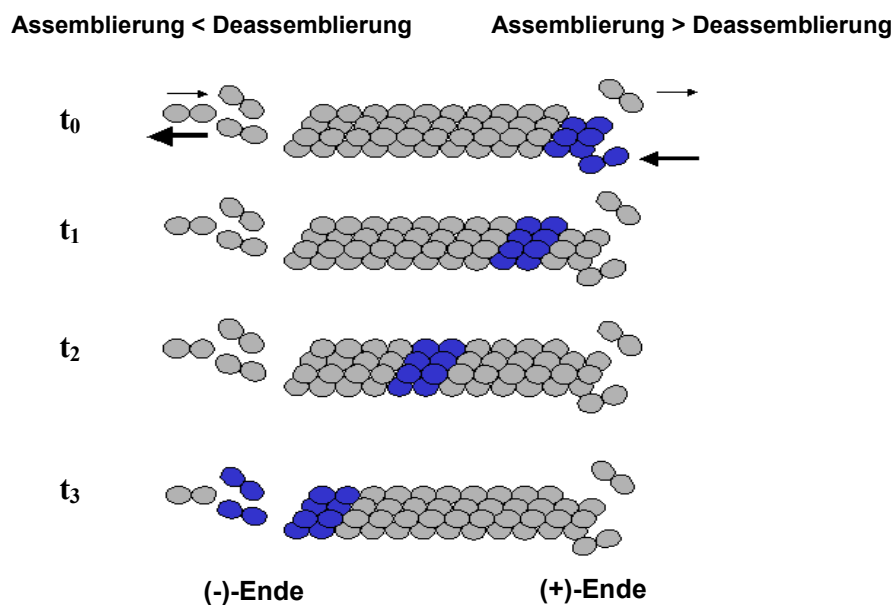


Abb. 1.7: Der Tretmühlen-Mechanismus im Gleichgewichtszustand *in vitro* demonstriert den Fluss von Tubulin-Untereinheiten vom Plus- zum Minus-Ende in Abhängigkeit von der Zeit.

Der Gleichgewichtszustand eines Mikrotubulus kann sich jedoch sehr schnell ändern. Diese Eigenschaft kann durch das Modell der „dynamischen Instabilität“ erklärt werden. Nur MT, die eine endständige GTP-Kappe tragen, sind stabil (Mitchison & Kirschner, 1984). In dem Moment, in dem ein Mikrotubulus durch Hydrolyse zu GDP-Tubulin seine GTP-Kappe verliert, bevor neues GTP-Tubulin assoziiert, kommt es zu einem schlagartigen Zerfall des Mikrotubulus.

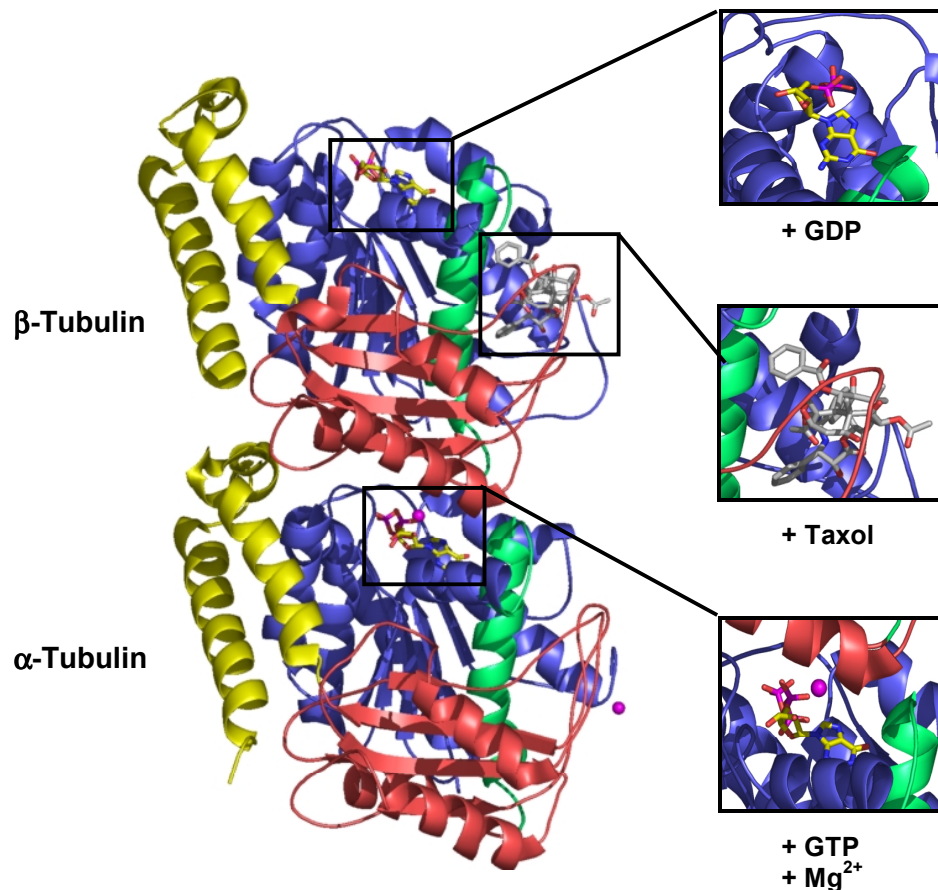
Tubulin-Heterodimere können prinzipiell autonom assemblieren. *In vivo* entspringen sie sogenannten „*microtubule organizing centres*“ (MTOCs), deren Aufgabe es ist, die Minus-Enden vor unkontrolliertem Abbau zu schützen. Hierbei ist das  $\gamma$ -Tubulin im MTOC besonders wichtig (Oakley & Oakley, 1989). Zwei Modelle beschreiben die Entstehung eines Mikrotubulus ausgehend vom  $\gamma$ -Tubulin. Im ersten Modell bildet  $\gamma$ -Tubulin initiale Protofilamente und leitet die Assemblierung der MT ein. Die Röhrenstruktur käme durch die nachfolgende laterale Anlagerung von  $\alpha/\beta$ -Heterodimeren an diese Protofilamente zustande. Das zweite Modell postuliert Multiprotein-Komplexe aus  $\gamma$ -Tubulin und akzessorischen Proteinen („ $\gamma$ -somes“), die als direkte Matrize die Nukleation der MT einleiten sollen (Erickson, 2000).

Die erfolgreiche Strukturaufklärung der  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere (Abb. 1.8) mittels Elektronenkristallographie kann als Meilenstein in der Tubulin-Forschung angesehen werden (Nogales *et al.*, 1998).

Ein Tubulin-Monomer ist besonders kompakt und besteht aus drei funktionell unterschiedlichen Domänen (Abb. 1.8). Die N-terminale, GTP/GDP-bindende Domäne besteht aus sechs parallelen  $\beta$ -Strängen (S1-S6/blau) alternierend mit sechs Helices (H1-H6/blau), wobei die  $\beta$ -Stränge ein paralleles Faltblatt ergeben. Eine weitere Helix (H7/grün) verbindet die N-terminale Domäne mit der kleineren zentralen Domäne, welche aus drei Helices (H8-H10/rot) und einem gemischten  $\beta$ -Faltblatt (S7-S10/rot) besteht. Die C-terminale Domäne besteht aus zwei antiparallelen Helices (H11-H12/gelb), welche die beiden vorherigen Domänen überkreuzen.

Die Lage der GTP-Nukleotide im Heterodimer erklärt die Regulation der GTP-Hydrolyse. Im  $\alpha$ -Tubulin liegt das GTP im Inneren des Dimers verborgen, so dass keine Hydrolyse und kein Austausch am  $\alpha$ -Tubulin möglich ist. In der  $\beta$ -Untereinheit ist das GTP teilweise an der Oberfläche exponiert, wodurch eine Hydrolyse und ein Austausch in Lösung ermöglicht werden (Abb. 1.8; Nogales, 1999).

Die C-terminalen Enden der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten liegen frei und ungeordnet im Kristall vor und konnten bisher noch nicht räumlich lokalisiert werden. Es wird vermutet, dass sie auch in den MT-Verbindungen auf der Außenseite des Moleküls liegen und damit für viele andere Proteine in der Zelle frei zugänglich sind. Dies erklärt, warum viele MT-assoziierte Proteine mit den auf Sequenzebene variablen C-Termini wechselwirken (Downing & Nogales, 1998 a, b; Nogales, 2001).



**Abb.1.8: Struktur des Tubulin-Heterodimers (modifiziert nach Löwe *et al.*, 2001)**

Die Abbildung zeigt  $\beta$ -Tubulin (oben) und  $\alpha$ -Tubulin (unten). Jedes Monomer besteht aus einer N-terminalen (blau), einer zentralen (rot) und einer C-terminalen Domäne (gelb). Die N-terminale Domäne ist über eine zentrale  $\alpha$ -Helix (grün) mit der zentralen Domäne verbunden.  $\beta$ -Tubulin bindet hier sowohl ein austauschbares GDP, als auch Taxol.  $\alpha$ -Tubulin hingegen bindet ein nicht austauschbares GTP und ein  $Mg^{2+}$ .

### 1.2.4 Ziel der Arbeit

Der Ausgangspunkt für diesen Teil der Arbeit war die Peptidligase Tubulin-Tyrosin Ligase, von der bisher noch keine geeigneten Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden konnten. Primäres Ziel war daher die Kristallisation und Aufklärung der räumlichen Struktur der TTL, um bisherige Kenntnisse über das Tubulin-modifizierende Enzym entscheidend zu erweitern.

Um einen detaillierten Einblick in TTL/Tubulin-Interaktion zu erhalten, sollte außerdem versucht werden, die TTL im Komplex mit substratanalogen Peptiden kozukristallisieren.

Ferner wurde im Rahmen dieses Projektes die Isolierung und Kristallisation des Komplexes zwischen TTL und  $\alpha/\beta$ -Tubulin als Basis für die Strukturaufklärung angestrebt, der nicht nur eine strukturelle Aussage über den hochvariablen und strukturell flexiblen C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin ermöglichen sollte, sondern auch erstmals Rückschlüsse über die molekulare Interaktion beider Proteine erlauben sollte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien, Lösungen und Enzyme wurden von den Firmen Aldrich, Amersham Pharmacia, Calbiochem, Difco, Fluka, Gerbu, GibcoBRL, Hampton Research, Merck, Millipore, New England Biolabs, Novagen, QIAGEN, Riedel de Hën, Roche, Roth, Sigma und Stratagene bezogen. Alle Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad *pro analysis (p.a.)*. Lösungen wurden entsprechend den Herstellerangaben und mit deionisiertem Wasser angesetzt, das mit einem MilliQ-System (Millipore; Molsheim, Frankreich) aufbereitet wurde.

### 2.2 Antikörper

**Tabelle 2.1: Monoklonale primäre Antikörper**

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Referenz
LA/C4	Maus	TTL	J. Wehland, GBF
ID3	Maus	TTL	J. Wehland, GBF
YL1/2	Ratte	Tyr-Tubulin	J. Wehland, GBF
L7	Kaninchen	Delta2-Tubulin	L. Paturle-Lafanechere, Grenoble
L4	Kaninchen	Glu-Tubulin	L. Paturle-Lafanechere, Grenoble
anti-(H) <sub>5</sub>	Maus	5 x Histidin	Qiagen; Hilden

**Tabelle 2.2: Polyklonale primäre Antikörper**

Bezeichnung	Spezies	Referenz
$\alpha$ -Enolase-Antikörper	Kaninchen	Pancholi & Fischetti, 1998
$\alpha$ -Kringel 1_3-Antikörper	Schaf	Acris; Bad Nauheim

**Tabelle 2.3: Sekundäre Antikörper**

Bezeichnung	Spezifizierung
A4a	Ziege-anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dianova)
B4c	Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dianova)
J4c	Ziege-anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dianova)

## 2.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.4: Bakterienstämme

Organismus	Geno/Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>E. coli</i> XL1-Blue <i>supercompetent cells</i>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10 tet<sup>r</sup></i> ]	Stratagene; Amsterdam
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) CodonPlus™ RIL	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS (r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>) dcm<sup>+</sup>Tet<sup>r</sup> galλ</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [ <i>argU ileY leuW Cam<sup>r</sup></i> ]	Stratagene; Amsterdam
<i>E. coli</i> TG2	<i>supE hsdD5 thiD (lac-proAB) Δ(srl-recA)</i> 306::Tn10( <i>tet<sup>r</sup></i> )/F'( <i>traD36 proAB lacI lac</i> ZΔM15)	Stratagene; Amsterdam
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Nal <sup>S</sup> , Str <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Thi <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>+</sup> , Gal <sup>+</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup>	Qiagen

## 2.4 Hefestämme

Tabelle 2.5: Hefestämme

Organismus	Geno/Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Wildtyp/Mut <sup>+</sup>	Invitrogen; Karlsruhe

## 2.5 Insektenzellenstämme

Tabelle 2.6: Insektenzellenstämme

Organismus	Zelllinie	Referenz/Herkunft
<i>Trichoplusia ni</i>	High-Five™ BTI-TN-5B-4	Invitrogen; Karlsruhe

## 2.6 Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide

### 2.6.1 Vektoren und Plasmide

Die Expression des jeweiligen Zielgens mit Plasmiden des GST *Gene Fusion Systems* (Amersham Biosciences, Freiburg) und des pQE Systems (Qiagen, Hilden) steht unter der Kontrolle des vom Bakteriophagen T5 abgeleiteten *lac*-UV5/*tac*-Promotor-Systems, welches durch das Laktoseanalogon Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) induziert wird (Dubendorff & Studier, 1991). Die Vektoren des *Pichia pastoris*-Expressionssystems enthalten die Promotor/Operator-Region des Alkoholoxidasegens *AOX1* und *AOX2*, das durch Methanol induziert wird. Die Vektoren des Baculovirus-Expressionssystems stehen unter der Kontrolle des Polyhedrin- und p10-Promotors. Das Zielgen wird durch homologe Rekombination in das Genom des Ausgangsvirus nach Transfektion der Insektenzellen inseriert und exprimiert.



Tabelle 2.7: Vektoren

Vektor	Größe	Selektion	Referenz/Herkunft
pGEX-6P-1	4.9 kb	Amp <sup>R</sup>	Smith & Johnson, 1988 (Amersham Biosciences, Freiburg)
PGEX-2TK	4.9 kb	Amp <sup>R</sup>	Smith & Johnson, 1988 (Amersham Biosciences, Freiburg)
pQE-30	3.7 kb	Amp <sup>R</sup>	Qiagen; Hilden
pPICZA	3.3 kb	Zeo <sup>R</sup>	Invitrogen; Karlsruhe
pPICZαA	3.6 kb	Zeo <sup>R</sup>	Invitrogen; Karlsruhe
pFASTBAC <sup>TM</sup> 1	4.8 kb	Gm <sup>R</sup>	Invitrogen; Karlsruhe

Tabelle 2.8: Rekombinante Plasmide zur heterologen Expression der TTL aus *Sus scrofa*

Plasmid	Beschreibung	Vektor	Oligonukleotide (Tabelle 2.10)	Referenz
pWT-TTL 6 kb	1.1 kb <i>t1l</i> cDNA aus <i>Sus scrofa</i>	pGEX-6P-1	Erck <i>et al.</i> , 2000	
pTTL11 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 238, 244 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 3, 4	diese Arbeit
pTTL12 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 238, 244, 338 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 3, 4, 6	diese Arbeit
pTTL13 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 91, 238, 244 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 2, 3, 4	diese Arbeit
pTTL14 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 238, 244, 294 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 3, 4, 5	diese Arbeit
pTTL15 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 238, 244, 347 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 3, 4, 7	diese Arbeit
pTTL16 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 91, 238, 244, 338 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 2, 3, 4, 6	diese Arbeit
pTTL17 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 238, 244, 338, 347 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 3, 4, 6, 7	diese Arbeit
pTTL18 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 91, 238, 244, 347 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 2, 3, 4, 7	diese Arbeit
pTTL19 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 91, 238, 244, 294, 347 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 7	diese Arbeit
pTTL20 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 91, 238, 244, 338, 347 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 2, 3, 4, 6, 7	diese Arbeit
pTTL21 6 kb	pWT-TTL mit Mutationen C72, 91, 238, 244, 294, 338, 347 S	pGEX-6P-1	Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	diese Arbeit
pTTL19Δ6 6 kb	pTTL 17 mit Deletionen A112 -E113	pGEX-6P-1	Nr. 19	diese Arbeit
pTTL19Δ9 6 kb	pTTL 17 mit Deletionen I245 -K247	pGEX-6P-1	Nr. 20	diese Arbeit
pTTL19Δ10 6 kb	pTTL 17 mit Deletionen K247 -Y249	pGEX-6P-1	Nr. 21	diese Arbeit
pTTL K150A, 6 kb	pWT-TTL mit Mutation K150A	pGEX-6P-1	Nr. 15	Studienarbeit Oliver Papp
pTTL G157A, 6 kb	pWT-TTL mit Mutation G157A	pGEX-6P-1	Nr. 16	Studienarbeit Oliver Papp
pTTL D318A, 6 kb	pWT-TTL mit Mutation D318A	pGEX-6P-1	Nr. 17	Studienarbeit Oliver Papp

Plasmid	Beschreibung	Vektor	Oligonukleotide (Tabelle 2.10)	Referenz
pTTL-Throm	1.1 kb <i>tth</i> cDNA aus pWT-TTL	pGEX-2TK	keine	diese Arbeit
pTTL-His1	1.1 kb <i>tth</i> cDNA aus pWT-TTL	pQE-30	keine	diese Arbeit
pTTL-His2	1.1 kb <i>tth</i> cDNA aus pWT-TTL	pPICZA	keine	diese Arbeit
pTTL-His3	1.1 kb <i>tth</i> cDNA aus pWT-TTL	pFASTBAC1	keine	diese Arbeit

**Tabelle 2.9: Rekombinante Plasmide zur heterologen Expression der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* und der Kringle-Fragmente aus humanem Plasminogen**

Plasmid	Beschreibung	Vektor	Oligonukleotide (Tabelle 2.11-13)	Referenz
pWT-Eno	1.3 kb <i>eno</i> Fragment aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	pQE-30	Bergmann <i>et al.</i> , 2001	
pK1	0.25 kb <i>Kringle 1</i> Fragment aus humanem Plasminogen	pGEX-6P-1	S. Bergmann, GBF	
pK2	0.25 kb <i>Kringle 2</i> Fragment aus humanem Plasminogen	pGEX-6P-1	S. Bergmann, GBF	
pK3	0.25 kb <i>Kringle 3</i> Fragment aus humanem Plasminogen	pGEX-6P-1	S. Bergmann, GBF	
pWT-K1_3	0.8 kb <i>Kringle 1_3</i> Fragment aus humanem Plasminogen	pGEX-6P-1	S. Bergmann, GBF	
pK1-His	0.25 kb <i>Kringle 1</i> Fragment aus humanem Plasminogen	pQE-30	keine	diese Arbeit
pK2-His	0.25 kb <i>Kringle 1</i> Fragment aus humanem Plasminogen	pQE-30	keine	diese Arbeit
pK3-His	0.25 kb <i>Kringle 1</i> Fragment aus humanem Plasminogen	pQE-30	keine	diese Arbeit
pK1_3-Hefe1	0.8 kb <i>Kringle 1_3</i> Fragment aus humanem Plasminogen; Wildtyp	pPICZA	keine	diese Arbeit
pK1_3-Hefe2	0.8 kb <i>Kringle 1_3</i> Fragment aus humanem Plasminogen; Wildtyp	pPICZ $\alpha$ A	Nr. 23, 24, 25	diese Arbeit
pK1_3-Hefe3	0.8 kb <i>Kringle 1_3</i> Fragment aus humanem Plasminogen; mit Mutation N289E	pPICZ $\alpha$ A	Nr. 23, 24, 25	diese Arbeit
pWT-K1_5	1.2 kb <i>Kringle 1_5</i> Fragment aus humanem Plasminogen	pGEX-6p-1	S. Bergmann, GBF	
pK1_4-Hefe	1.0 kb <i>Kringle 1_4</i> Fragment aus pWT-K1-5 mit Mutation N289E	pPICZ $\alpha$ A	Nr. 22, 27, 28	diese Arbeit
pK1_5-Hefe	1.2 kb <i>Kringle 1_5</i> Fragment aus pWT-K1-5 mit Mutation N289E	pPICZ $\alpha$ A	Nr. 22, 26, 28	diese Arbeit

### 2.6.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) hergestellt und in lyophilisierter Form geliefert. Alle Oligonukleotide wurden in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.6, 1 mM EDTA) resuspendiert und auf eine DNA-Konzentration von 100 pmol/ $\mu$ L eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabelle 2.10: Mutagenese-Oligonukleotide (TTL)**

Bei Oligonukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese ist der Gegenstrang-Primer zur übersichtlicheren Darstellung der eingefügten Mutation in 3' → 5'-Richtung aufgeführt. Die eingefügte Mutation ist jeweils unterstrichen. Deletierte AS ist durch ein Leerzeichen an der Deletionsstelle dargestellt.

Primer-Nr.	Primerpaar	Sequenz
1	5'-TTL-C72S 3'-TTL-C72S	5'-GCCGACAAACTGTCTCGCAAAGCTTCC-3' 3'-CGGCTGTTTGACAGAGCGTTTCGAAGG-5'
2	5'-TTL-C91S 3'-TTL-C91S	5'-CTGGCTAGTTCTCCACGTGGTTCCC-3' 3'-GACCGATCAAGGAGGTGCACCAAGGG-5'
3	5'-TTL-C238S 3'-TTL-C238S	5'-CAAGACAAAACCTCCCATTGACCAATC-3' 3'-GTTCTGTTTTGGAGGGTAACTGGTTAG-5'
4	5'-TTL-C244S 3'-TTL-C244S	5'-CATTTGACCAATCACTCCATTGAGAAGGAG-3' 3'-GTAAACTGGTTAGTGAGGTAAGTCTTCCTC-5'
5	5'-TTL-C294S 3'-TTL-C294S	5'-CATATAATAAGGAGCTCCCTCCTGAGCG-3' 3'-CTATATTATTCTCGAGGGAGGACTCGC-5'
6	5'-TTL-C338S 3'-TTL-C338S	5'-CGCCCCGGCTTCTGCTCAGAAGCTC-3' 3'-GCGGGGCCGAAGACGAGTCTTCGAG-5'
7	5'-TTL-C347S 3'-TTL-C347S	5'-CTACGCTGAGCTGTCTCAAGGCATCG-3' 3'-CATGCGACTCGACAGAGTTCCGTAGC-5'
8	5'-TTL-S72A 3'-TTL-S72A	5'-GCCGACAAACTGGCTCGCAAAGCTTCC-3' 3'-CGGCTGTTTGACCGAGCGTTTCGAAGG-5'
9	5'-TTL-S91A 3'-TTL-S91A	5'-CTGGCTGAGTCCGCCACGTGGTTCCC-3' 3'-GACCGACTCAGGCGGTGCACCAAGGG-5'
10	5'-TTL-S238A 3'-TTL-S238A	5'-CAAGACAAAACCGCCCATTGACCAATC-3' 3'-GTTCTGTTTTGGCGGGTAACTGGTTAG-5'
11	5'-TTL-S244A 3'-TTL-S244A	5'-CATTTGACCAATCACGCCATTGAGAAGGAG-3' 3'-GTAAACTGGTTAGTGCGGTAAGTCTTCCTC-5'
12	5'-TTL-S294A 3'-TTL-S294A	5'-CATATAATAAGGAGCGCCCTCCTGAGCG-3' 3'-GTATATTATTCTCGCGGGAGGACTCGC-5'
13	5'-TTL-S338A 3'-TTL-S338A	5'-CGCCCCGGCTGCTGCTCAGAAGCTC-3' 3'-GCGGGGCCGACGACGAGTCTTCGAG-5'
14	5'-TTL-S347A 3'-TTL-S347A	5'-CTACGCTGAGCTGGCTCAAGGCATCG-3' 3'-GATGCGACTCGACCGAGTTCCGTAGC-5'
15	5'-TTL-K150A 3'-TTL-K150A	5'-GTTTGGATTGCAGCGTCATCGGCTGG-3' 3'-CAAACCTAACGTTCGCAGTAGCCGACC-5'
16	5'-TTL-G157A 3'-TTL-G157A	5'-GCTGGAGCCAAAGCTGAAGGCATCC-3' 3'-CGACCTCGGTTTCGACTTCGGTAGG-5'
17	5'-TTL-D318A 3'-TTL-D318A	5'-CTCTTCGGCTTCGCCTTCATGGTGG-3' 3'-GAGAAGCCGAAGCGGAAGTACCACC-5'
18	5'-TTL-K137-139E 3'-TTL-K137-139E	5'-CTTCTTACAACGAAGAGGAAGAAGATGGAG-3' 3'-GAAGAATGTTGCTTCTCCTTCTTCTACCTC-5'
19	5'-TTL-delta 6 3'-TTL-delta 6	5'-CCTCAAGACCCCAGTTGCTCCA AATGGAATCCACCCACCAATCC-3' 3'-GGAGTTCTGGGGTCAACGAGGT TTACCTTAGGTGGGTGGTTAGG-5'
20	5'-TTL-delta 9 3'-TTL-delta 9	5'-GCCATTTGACCAATCACTGC GAGTACTCGAAGAATTATGG-3' 3'-CGGTAAACTGGTTAGTGACG CTCATGAGCTTCTTAATACC-5'
21	5'-TTL-delta 10 3'-TTL-delta 10	5'-GACCAATCACTGCATTGAG TCGAAGAATTATGGAAAGTATG-3' 3'-CTGGTTAGTGACGTAAGTC AGCTTCTTAATACCTTTCATAC-5'

**Tabelle 2.11: Mutagenese-Oligonucleotide (Kringle 1-3)**

Bei Oligonukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese ist der Gegenstrang-Primer zur übersichtlicheren Darstellung der eingefügten Mutation in 3'→5'-Richtung aufgeführt. Die eingefügte Mutation ist jeweils unterstrichen.

Primer Nr.	Primerpaar	Sequenz
22	5'-K1_3-N289E 3'-K1_3-N289E	5'-CCTCACACACAT <u>GAGAGGACACCAGAAAAC</u> -3' 3'-GGAGTGTGTGTACTCTCCTGTGGTCTTTTG-5'

**Tabelle 2.12: Adapter-Oligonukleotide (Kringle)**

Primer Nr.	Primerpaar	Sequenz
23	Linker 1 Linker 2	5'-CCATCATCATCATCATCATTGAT-3' 5'-CTAGATCAATGATGATGATGATGATGATGGGTAC-3'

**Tabelle 2.13: PCR-Oligonukleotide**

Die Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsnukleasen sind unterstrichen.

Primer Nr.	Primerpaar	Sequenz
24	5'-EcoRI-K1_3	5'-AGAAGGAATTCTCAGAGTCAAGACTGG-3'
25	3'-KpnI-K1_3	5'-AAGGAGGTACCGAGTCACAGGACG-3'
26	3'-KpnI-K5	5'-AAGGAGGTACCAGGGGCCGCACACTGAGGGAC-3'
27	3'-KpnI-K4	5'-AAGGAGGTACCAACACTCGCTTCTGTTCTGAGC-3'
28	5'-ApaLI-K3	5'- AAGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATGAGAGGACACCAGAAAACCTCC- 3'

## 2.7. Standards

### 2.7.1 DNA-Größenstandards

Die Standards wurden als gebrauchsfertige Lösungen verwendet (0.9 µg DNA/Laufspur).

**Tabelle 2.14: DNA-Größenstandards**

Bezeichnung	Größenbereich	Hersteller
Smart Ladder	200–10000 bp	Eurogentec; Belgien
1 Kb Plus DNA Ladder	100-12000 bp in 1000 bp-Schritten	Invitrogen; Karlsruhe

### 2.7.2 Molekulargewichtsmarker

Von der gebrauchsfertigen Lösung wurden jeweils 5 µL/Laufspur verwendet.

**Tabelle 2.15: Proteingrößenstandards**

Bezeichnung	Größenbereich	Hersteller
10 kDa Protein Ladder	10 – 200 kDa in 10 kDa-Schritten	Invitrogen; Karlsruhe
Prestained, Broad Range	10-250 kDa	Bio Rad; München
BenchMark™ Protein Ladder	10-220 kDa	Invitrogen; Karlsruhe

## 2.8 Mikrobiologische Methoden

### 2.8.1 Kulturmedien und Antibiotika

Alle Medien für die Bakterien- und Hefekulturen wurden durch Autoklavieren (30 min, 121°C) sterilisiert. Hitzeempfindliche Medienkomponenten wurden sterilfiltriert (0.2 µm-Filter) und dem abgekühlten autoklavierten Medium zugegeben. Alle Mengenangaben beziehen sich immer auf einen Liter Medium. Wenn nicht anders angegeben, wurde der pH-Wert des Mediums vor dem Autoklavieren auf pH 7.5 eingestellt.

**a) LB (Luria broth)-Medium** (nach Sambrook, 1989): zur Kultivierung von *E. coli*

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar (für festes Medium)	15 g

**b) SOC-Medium** (nach Sambrook, 1989): zur Transformation von *E. coli*

**SOB-Medium:**

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0.583 g
KCl	0.18 g

Zu 98 mL SOB-Medium werden je 1 mL Glucose (2 M) und  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  (2 M) zugefügt.

**c) NZY<sup>+</sup>-Medium** (nach Sambrook, 1989): zur Transformation von *E. coli* XL-1 Blue

NZ-Amine	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

Zu 1 L Medium wurden jeweils 12.5 mL  $\text{MgCl}_2$  (1 M), 12.5 mL  $\text{MgSO}_4$  (1 M) und 10 mL Glucose (2 M) zugefügt.

**d) YPD-Medium:** zur generellen Anzucht und Lagerung von Hefen

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Agar (für festes Medium)	15 g

Zu 0.9 L Medium werden 100 mL 20 % Dextrose zugefügt.

**e) YPDS-Medium:** zur Selektion von Hefe-Transformanden

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Sorbitol	182.2 g
Agar (für festes Medium)	15 g

Zu 0.9 L Medium werden 100 mL 20 % Dextrose zugefügt.

**f) BMGY-Medium:** *P. pastoris*; Vollmedium

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g

Zu 700 mL Medium werden 100 mL Kaliumphosphat-Puffer (1 M, pH 6.0), 100 mL YNB (13.4 %), 2 mL Biotin (0.02 %) und 100 mL Glycerol (10 %) zugefügt.

**g) BMMY-Medium:** *P. pastoris*, Minimalmedium

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g

Zu 700 mL Medium werden 100 mL Kaliumphosphat-Puffer (1 M, pH 6.0), 100 mL YNB (13.4 %), 2 mL Biotin (0.02 %) und 100 mL Methanol (5 %) zugefügt.

**h) Optimem-Medium:** zur Kultivierung von Hybridomazellen

Optimem	500 mL
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	50 U/mL
Streptomycin	50 µg/mL

**i) Antibiotika**

Alle Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ampicillin und Kanamycin wurden in  $\text{H}_2\text{O}$  und Chloramphenicol wurde in 70 % (v/v) Ethanol gelöst. Zeocin wurde als gebrauchsfertige Lösung von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Arbeitskonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/mL
Chloramphenicol	34 µg/mL
Zeocin	100 µg/mL
Kanamycin	30 µg/mL

**2.8.2 Kultivierung, Anzucht und Stammhaltung von *E. coli***

Für die Kultivierung von *E. coli*-Zellen wurden 5-100 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und in einem Schüttelinkubator ü.N. bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 180 UpM inkubiert. Zur Anzucht von *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus<sup>TM</sup> wurde dem Kulturmedium 34 µg/mL Chloramphenicol zugefügt. Zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen, die das Plasmid pGEX-6P-1 bzw. dessen Derivate enthielten, erfolgte die Zugabe von 100 µg/mL Ampicillin zum Medium. Stämme, die Plasmide der pQE-Vektoren enthielten, wurden mit 100 µg/mL Ampicillin und 30 µg/mL Kanamycin kultiviert.

Zur Proteinproduktion wurde die Hauptkultur mit einer Vorkultur (LB-Medium) auf eine optische Dichte ( $A_{600}$ ) von 0.1 eingestellt und im Schüttelinkubator ( $37^{\circ}\text{C}$ , 180 UpM) inkubiert.

Bei einer Zelldichte von  $A_{600} = 0.5-0.8$  wurde die Proteinproduktion mit 0.1 mM IPTG induziert und für weitere 18 h bei entsprechender Induktionstemperatur und 180 UpM kultiviert.

Zur Kultivierung von *E. coli* auf LB-Agarplatten wurden 50-150 µL einer Zellsuspension gleichmäßig bis zum Eintrocknen mit einem Drigalskispatel auf der Agarplatte verteilt, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthielt. Die Inkubation der Platten erfolgte ü.N. bei  $37^{\circ}\text{C}$ .

Für die dauerhafte Lagerung von *E. coli*-Stammkulturen wurden Einzelkolonien in 5 mL LB-Medium überführt und ü.N. bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln kultiviert. Die Bakterienkulturen wurden mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 40 %) und in 800 µL-Aliquots bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.8.3 Kultivierung, Anzucht und Stammhaltung von *Pichia pastoris*

Für die Kultivierung von *P. pastoris*-Zellen wurden 25 mL BMGY-Medium, mit 100 µg/mL Zeocin, mit einer Einzelkolonie beimpft und in einem Schüttelinkubator bei 30°C und 180 UpM inkubiert.

Zur Proteinproduktion wurde die Hauptkultur (BMGY-Medium) mit einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte ( $A_{600}$ ) von 2-6 bei 30°C und 180 UpM kultiviert. Die Proteinproduktion wurde mit 0.5 % Methanol (Endkonzentration) induziert. Zur kontinuierlichen Proteinproduktion wurden alle 24 h bis zum Ende der Kultivierung erneut 0.5 % Methanol zugefügt.

Zur Kultivierung der Hefezellen auf Agarplatten wurden 50-150 µL Zellsuspension gleichmäßig mit einem Drigalskispatel auf der Agarplatte (YPD-Medium) bis zum Eintrocknen der Flüssigkeit verteilt. Die Inkubation erfolgte über mehrere Tage bei 30°C.

Für die dauerhafte Lagerung von Hefe-Stammkulturen wurden Einzelkolonien in 5 mL YPD-Medium überführt und ü.N. bei 30°C unter Schütteln kultiviert. Nach der Zellernte wurde das Zellpellet in YPD-Medium mit 15 % Glycerin resuspendiert (finale  $A_{600}$  = 50-100) und bei -70°C gelagert.

### 2.8.4 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

#### a) Herstellung $\text{CaCl}_2$ -kompetenter *E. coli*-Zellen und Transformation

Eine Übernachtskultur entsprechender *E. coli*-Zellen wurde in SOC-Medium (2 x 300 mL) bis zu einer  $A_{600}$  von 0.5 angezogen und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (5500 UpM, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 20 mL eiskalter 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der Zellen (5500 UpM, 10 min, 4°C) wurden diese in 3 mL eiskalter 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgenommen und für 3 h auf Eis gehalten. Die  $\text{CaCl}_2$ -kompetenten Zellen wurden nach Zugabe von 15 % (v/v) Glycerin in 300 µL-Portionen aliquotiert und bei -70°C gelagert.

Die zu transformierende DNA (100 ng) wurde vorsichtig mit 50 µL  $\text{CaCl}_2$ -kompetenter Zellen auf Eis vermischt. Es folgte eine sukzessive Inkubation von 5 min bei 37°C und 10 min auf Eis (2 Wiederholungen). Nach Zugabe von 800 µL SOC-Medium wurde die Zellsuspension für 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Drigalskispatel auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche die entsprechenden Antibiotika zur Selektion transformierter Kolonien enthielten. Nach Inkubation der Transformationsplatten (ü.N., 37°C) wurden die erhaltenen Einzelkolonien zur weiteren Kultivierung mit sterilen Spitzen in 5 mL LB-Medium überführt bzw. auf frischen LB-Agarplatten zu Einzelkolonien ausgestrichen und bei 37°C kultiviert.

#### b) Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris*-Zellen und Transformation

500 mL YPD-Medium wurden mit einer ü.N.-Kultur des zu transformierenden Hefe-Stamms beimpft und als Schüttelkultur bei 30°C inkubiert. Bei einer  $A_{600}$  von 1.3-1.5 wurden die Zellen durch Zentrifugation in sterilen Zentrifugenbechern sedimentiert (JA-10-Rotor, 1500 xg, 4°C, 5

min). Das Pellet wurde in 500 mL sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert (Wiederholung des Schrittes mit 250 mL sterilem H<sub>2</sub>O). Nach erneuter Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen in 20 mL eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden abschließend in 1 mL 1 M Sorbitol (Gesamtvolumen 1.5 mL) resuspendiert und bis zur Transformation stets auf Eis gehalten. Elektrokompente Hefezellen müssen immer frisch hergestellt werden, und können nicht gelagert werden.

Die linearisierte Plasmid-DNA (10 µg) wurde mit 80 µL elektrokompenter Zellen auf Eis vermischt, in eine gut gekühlte Elektroporationsküvette überführt und für 5 min auf Eis gehalten. Die Elektroporation erfolgte bei 1.5 V, 25 µF und 200 Ω. Der Transformationsmix wurde sofort mit 1 mL eiskaltem 1 M Sorbitol vermischt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 2 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 50, 100 und 200 µL auf YPDS-Agarplatten mit 100 µg/mL Zeocin ausplattiert. Nach Inkubation der Transformationsplatten (2-3 Tage, 30°C) wurden die erhaltenen Einzelkolonien zur weiteren Kultivierung mit sterilen Spitzen in 5 mL YPD-Medium überführt bzw. auf frischen YPD-Agarplatten zu Einzelkolonien ausgestrichen und bei 30°C kultiviert.

## 2.9 Biochemische Methoden

### 2.9.1 Herstellung von *E. coli*-Gesamtzellaufschlüssen und Zellextrakten

Für die Analyse von Gesamtzellproteinen wurde ca. 1 mL *E. coli*-Flüssigkultur nach Bestimmung der A<sub>600</sub> für 5 min bei 14000 UpM und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0.1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin) aufgenommen und im SDS-Gel analysiert.

Für die Präparation von intrazellulär produzierten Fusionsproteinen wurden die Zellen durch Zentrifugation (JA10-Rotor, 5000 UpM, 10 min) pelletiert. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert (V = 30 mL). Nach Zugabe eines Protease-Inhibitor-Cocktails (1 Tablette, Roche) und 5 µL Benzonase (DNase; Roche) wurden die Zellen mittels French-Press-Technik (3 x 1500 psi) aufgeschlossen.

Das Lysat wurde für 1 h bei 17000 UpM und 4°C zentrifugiert (JA-18-Rotor). Der klare Überstand enthält nach der Zentrifugation die löslichen Zellproteine. Zur Analyse der unlöslichen Proteine wurden die sedimentierten Zelltrümmer in Resolubilisierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 8 M Harnstoff) aufgenommen und ebenfalls zentrifugiert (1 h, 17000 UpM, 4°C). Der Überstand enthielt nach diesem Zentrifugationsschritt die wasserunlöslichen Proteine. Die Fraktion der löslichen Proteine wurde für die Isolierung und Reinigung der Fusionsproteine weiterverwendet. Die Fraktion der unlöslichen Proteine wurde nach einer Analyse im SDS-Gel nicht weiterverwendet.



### 2.9.2 Isolierung und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Bei dem Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionssystem (Amersham Biosciences, Freiburg) wird das Zielprotein zur heterologen Produktion in *E. coli* mit GST (26 kDa) fusioniert. Da GST spezifisch und mit hoher Affinität an Glutathion bindet, können GST-Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Unter Verwendung von Glutathion, das über Oxiran-Gruppen kovalent an Sepharose 4B gekoppelt ist, erhält man in einem einzigen Schritt bis zu über 90 % reines Fusionsprotein.

Die Proteinproduktion, Zellernte und der Zellaufschluss erfolgten wie in den Kapiteln 2.8.2 und 2.9.1 beschrieben.

Das klare Lysat (lösliche *E. coli* Gesamtzellproteine) wurde direkt zur frisch äquilibrierten Glutathion Sepharose 4B (GS; Bindekapazität: >8 mg GST/mL; Äquilibration nach Herstellerangaben) gegeben und leicht rotierend für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Immobilisierung der GST-Fusionsproteine wurde die GS in eine PD-10-Minisäule (Amersham Biosciences) überführt. Unspezifisch gebundene *E. coli*-Proteine wurden mit PBS-Puffer (137 mM NaCl, 26.5 mM KCl, 1.5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, pH 7.2) unter Verwendung einer Schlauchpumpe entfernt. Der Waschschritt wurde mit einem Durchflussphotometer überwacht und erfolgte bis zum Absinken der Absorption bei 280 nm (A<sub>280</sub>) auf den Wert von PBS.

Nach dem Waschen der GS erfolgte eine Elution des Fusionsproteins mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM red. Glutathion, 5 mM DTT).

Nach der Elution wurde das Zielprotein durch eine sequenzspezifische Protease von der Fusions-einheit getrennt (PreScission Protease; Amersham Biosciences; Freiburg). Die Abspaltung der GST-Fusionseinheit erfolgte durch Zugabe von 80 µL (pro 50 mL Eluat) PreScission Protease (833-1000 U/mL) bei gleichzeitiger Dialyse gegen PreScission Protease-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) ü.N. bei 4°C. Zur Entfernung der abgespaltenen GST-Fusionseinheit, der PreScission Protease und Resten von ungespaltenen Fusionsproteinen wurde die Proteinlösung nach der Proteolyse erneut für 1 h bei 4°C unter Rotation mit frischer GS inkubiert. Anschließend wurde die GS wieder in ein PD-10-Röhrchen gegeben. Das Zielprotein befand sich im Durchlauf, während die Protease und die GST-Fusionseinheit an der GS zurückgehalten wurden (Überwachung der A<sub>280</sub>).

### 2.9.3 Isolierung und Reinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen

Bei der pQE-Vektorserie wird das Zielprotein am N- oder C-Terminus mit sechs konsekutiven Histidinen (His<sub>6</sub>) fusioniert. Durch diese Fusion kann eine metallaffinitätschromatographische Reinigung des Zielproteins mit Nickel-Nitriloessigsäure-Agarose (Ni-NTA; Qiagen) erfolgen.

Die Proteinproduktion, Zellernte und der Zellaufschluss erfolgten wie in den Kapiteln 2.8.2 und 2.9.1 beschrieben. Im Fall von sekretorisch produzierten Proteinen entfiel der Zellaufschluss. Hier wurde der Mediumüberstand durch Zentrifugation von den Zellen getrennt und direkt für die Affinitätschromatographie verwendet.

Das klare Lysat der löslichen Gesamtzellproteine bzw. der Kulturüberstand wurde anschließend mit Ni-NTA (8 mL Ni-NTA/klare Lysate bzw. 20 mL Ni-NTA/2L Kulturüberstand), die zuvor mit Kopplungspuffer (20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl) äquilibriert worden war, 1 h unter leichtem Rotieren bei 4°C inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde in eine PD-10-Minisäule überführt.

Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit dem Kopplungspuffer unter Verwendung einer Schlauchpumpe entfernt. Der Waschschritt wurde mit einem Durchflussphotometer überwacht und erfolgte bis zum Absinken der  $A_{280}$  auf den Wert des Kopplungspuffers. Nach dem Waschen erfolgte eine Elution des His<sub>6</sub>-Fusionsproteins mit Elutionspuffer (Imidazol pH 7.5 (versch. Konzentrationen) in Kopplungspuffer).

Zur Entfernung von Imidazol wurde die Proteinlösung gegen Niedrigsalzpuffer (20 mM Hepes pH 7.5 (für  $\alpha$ -Enolase und Kringle); 20 mM Citratpuffer pH 6.0 (für TTL)) für nachfolgende Reinigungsschritte mittels Ionenaustauschchromatographie (Kapitel 2.9.6.2) bzw. Gelpermeationschromatographie (Kapitel 2.9.6.1) dialysiert (Kapitel 2.9.7).

#### 2.9.4 Produktion und Reinigung von monoklonalen Antikörpern

Um größere Mengen an monoklonalen Antikörpern herzustellen, wurden große Mengen an Kulturüberstand gewonnen. Die Antikörperproduktion steigt proportional mit der Zelldichte und der Vitalität der Zellen. Um alle Faktoren möglichst optimal zu kombinieren, wurden sogenannte Rollkulturen angesetzt. Hierfür wurden die Hybridomazellklone bei einer Zelldichte von  $10^8$  Zellen in eine 2 L-Flasche umgesetzt und mit 200 mL Medium bei 37°C und 8 % CO<sub>2</sub> auf einer Rollkulturanlage inkubiert. Nach 7 Tagen erfolgte ein Auffüllen auf 400 mL Medium und eine Inkubation für eine weitere Woche. Die monoklonalen Antikörper gegen TTL für Kokristallisationsexperimente in dieser Arbeit wurden von Frau H. Schwab-Hanisch (GBF) kultiviert, über Protein G-Sepharose gereinigt und konzentriert.

#### 2.9.5 Herstellung von Fab-Fragmenten aus monoklonalen Antikörpern

Die Herstellung von Fab-Fragmenten aus monoklonalen Antikörpern erfolgte mit dem *ImmunoPure® Fab Preparation Kit* (Pierce) nach Herstellerangaben.

#### 2.9.6 Isolierung von $\alpha/\beta$ -Tubulin aus Rinderhirn

Der Reinigungsprozess wurde, außer den Polymerisationsphasen, bei 4°C durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen und Puffer waren eisgekühlt. Etwa 700 g frisches Rinderhirn wurde von Hirnhäuten und Blutgefäßen befreit und mehrfach mit eiskalter 0.9 %iger Kochsalzlösung blutfrei gewaschen. Die Hirnmasse wurde dann in 550 mL PEM-Puffer (0.1 M PIPES pH 6.6, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA) in einem Mixer homogenisiert (3 x 15 sec, langsame Stufe). Die Zelltrümmer wurden für 45 min bei 35000 UpM und 4°C abzentrifugiert. Zum Überstand

(ca. 450 mL) wurden 0.1 mM GTP und 2 mM ATP zugegeben und bei 30°C im Wasserbad inkubiert (Polymerisation der MT) gelöst. Der Überstand wurde dann in 200 mL-Portionen aufgeteilt und diese wurden im Zentrifugenbecher mit 10 %iger Saccharoselösung in PEM-Puffer unterschichtet und für 1.5 h bei 30°C und 35000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vom MT-Pellet entfernt. Das MT-Pellet wurde in PEM-Puffer resuspendiert und 30 min lang zur Depolymerisation auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zugabe von 1 mM GTP erfolgte eine zweite Inkubation bei 30°C für 30 min mit anschließender Zentrifugation (45 min, 35000 UpM, 30°C). Die Überstände wurden verworfen und die gesamten Pellets in insgesamt 75 mL eiskaltem PEM-Puffer aufgenommen und in einem Teflon-Glas-Homogenisator bei 2000 UpM homogenisiert. Zur vollständigen Depolymerisation der Mikrotubuli wurde das Homogenisat erneut 30 min lang auf Eis inkubiert und schließlich für 30 min bei 4°C und 35000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in 8 Ultrazentrifugationsgefäße verteilt und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (35000 UpM, 30 min, 30°C) wurden die Pellets in PEM-Puffer aufgenommen.

Die gereinigten Mikrotubuli enthielten neben Tubulin noch die sogenannten Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs). Tubulin kann durch Phosphocellulose von den MAPs getrennt werden (Sloboda & Rosenbaum, 1982).

#### Vorbehandlung der Phosphocellulose:

40 g Phosphocellulose (PC) wurden mit einem Liter 0.5 M NaOH für 5 min inkubiert. Die Lauge wurde abgesaugt und die PC mit Wasser bis zum Erreichen eines pH-Werts von 9 gewaschen. Danach wurde die PC mit 0.5 M HCl für 5 min inkubiert und nach Absaugen der Säure bis zum Erreichen eines pH-Werts von 4, unter mehrmaligem Aufschlännen mit Wasser, gewaschen. Nach dem Absetzen wurde der Überstand abgesaugt und die PC in Sättigungspuffer (0.1 mM PIPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, pH 6.6) aufgenommen. Die behandelte PC-Suspension wurde zum Befüllen einer Chromatographiesäule verwendet. Die gepackte Säule wurde anschließend mit Laufpuffer äquilibriert (0.1 mM PIPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, pH 6.6).

#### Tubulin-Reinigung:

Die isolierten Mikrotubuli wurden einem dritten Polymerisation-Depolymerisation-Zyklus unterworfen (s.o.), in Laufpuffer aufgenommen, filtriert (0.2 µm) und über die Säule gegeben. Das Tubulin (PC-Tubulin) eluierte im Durchlauf, während die MAPs auf der PC zurückgehalten wurden. Das Tubulin wurde konzentriert, 0.1 mM GTP (Endkonzentration) dazugegeben und zur Isolierung von detyrosiniertem Tubulin (Glu-Tubulin) eingesetzt.

#### Isolierung und Detyrosinierung von Tubulin:

PC-Tubulin enthält neben Glu-Tubulin zwei weitere Subspezies, das tyrosinierte Tubulin (Tyr-Tubulin) und das nicht-tyrosinierbare Tubulin ( $\Delta$ 2-Tubulin). Für Kristallisationsexperimente und Bindungsstudien wurde ausschließlich Glu-Tubulin verwendet, das wie folgt isoliert wurde:

Zunächst wurde das isolierte PC-Tubulin mit der TTL vollständig tyrosiniert. Die Tyrosinierung von ca. 100 mg PC-Tubulin erfolgte in PEM-Puffer unter Zugabe von 0.1 mM Tyrosin in DMSO, 1 mM DTT, 2.5 mM ATP, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0.05 U TTL (alles Endkonzentrationen) für 30 min bei 30 °C. Das tyrosinierte PC-Tubulin wurde mittels Gelfiltration in PEM-Puffer umgepuffert und auf eine zuvor mit PEM-Puffer äquilibrierte YL1/2-Antikörpersäule gegeben. Der Antikörper YL1/2 bindet Tyr-Tubulin, während  $\Delta 2$ -Tubulin durchläuft. Die Elution von Tyr-Tubulin erfolgte in Anwesenheit von 0.8 M KCl in PEM-Puffer.

Das isolierte Tyr-Tubulin wurde anschließend unter Zugabe von Carboxypeptidase A (Sigma; Endkonzentration 2 µg/mL Tyr-Tubulin) für 15 min bei 30°C wieder vollständig detyrosiniert. Die Inaktivierung der CPA erfolgte unter Zugabe von 20 mM DTT. Anschließend wurde die CPA mittels Gelfiltration wieder entfernt (PEM-Puffer in D<sub>2</sub>O). Das isolierte Glu-Tubulin wurde auf 10 mg/mL Protein konzentriert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –70°C gelagert.

## 2.9.7 Chromatographische Methoden

### a) Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) ist eine nichtadsorptive Trenntechnik. Lösliche Moleküle werden auf ihrem Weg durch chromatographisches Material entsprechend ihrer Größe und Form separiert. Kleine Moleküle diffundieren auf ihrem Weg in die Gelmatrix und werden dabei zurückgehalten. Große Moleküle können nicht in das Gel eindringen, bewegen sich kontinuierlich im angelegten Pufferstrom und werden somit schneller eluiert als kleine Moleküle.

In dieser Arbeit wurden vorgepackte Säulen verwendet (HiLoad™ 16/60 bzw. HiLoad™ 26/60 Superdex 75 und 200 *prep grade*; Amersham Biosciences, Freiburg). Die Kompositgelmatrix besteht aus hochquervernetzten, porösen Agarose-Kügelchen (34 µm) mit kovalent gebundenem Dextran. Der Trennbereich liegt zwischen 3 und 70 kDa bzw. 10 und 600 kDa. Vor der GPC wurde die Proteinlösung filtriert (0.45 µm-Filter). Das Eluat wurde unter Beobachtung der A<sub>280</sub> mittels Fraktionskollektor fraktioniert (*Biologic Workstation*, BioRad). In der SDS-PAGE analysierte Protein-haltige Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und bei 4°C gelagert.

**Tabelle 2.16: GPC**

	HiLoad™ 16/60 Superdex 75/200 <i>prep grade</i>	HiLoad™ 26/60 Superdex75/200 <i>prep grade</i>
<b>Säulendurchmesser</b>	1.6 cm	2.6 cm
<b>Säulenhöhe</b>	60 cm	60 cm
<b>V<sub>t</sub></b>	120 mL	340 mL
<b>V<sub>Elution</sub></b>	120 mL	340 mL
<b>max. Auftragsvolumen</b>	5 mL	13 mL
<b>Flussrate</b>	0.8 mL/min	1.5 mL/min
<b>Fraktionsgröße</b>	1.5 mL	4 mL

### b) Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Die Trennung von Substanzen mittels Ionenaustauschchromatographie erfolgt durch eine reversible Adsorption von geladenen löslichen Molekülen an immobilisierte Ionenaustauschgruppen von entgegengesetzter Ladung. Die Interaktion von Substanzen mit unterschiedlichen Nettoladungen und Ladungsverteilungen kann durch graduelle Veränderung der Ionenstärke des Laufmittels oder durch Anlegen eines linearen pH-Gradienten beeinflusst werden. Das Ionenaustauschmaterial besteht aus chemisch modifizierten Polymeren mit kovalent gebundenen positiv bzw. negativ geladenen Gruppen, die zur elektrostatischen Absättigung mit mobilen Gegenionen assoziiert sind. Diese Gegenionen können reversibel gegen andere Ionen der gleichen Ladung ausgetauscht werden.

Die Proteinlösung wurde vor der IEC zur Entfernung von Salzen gegen Niedrigsalzpuffer dialysiert, filtriert (0.45  $\mu\text{m}$ ) und über einen Superloop auf die mit Niedrigsalzpuffer äquilibrierte IEC-Säule geladen. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen linear ansteigenden Salzgradienten (0-1 M NaCl; Hochsalzpuffer). Das Eluat wurde unter Überwachung der  $A_{280}$  fraktioniert. Im SDS-Gel analysierte Protein-haltige Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und bei 4°C gelagert.

**Tabelle 2.17: IEC**

Säule	MonoQ bzw. MonoS HR10/10 (Pharmacia)
Säulenmaterial/Kapazität	MonoBeads/ 60 mg/mL
$V_t$	8 mL
$V_{\text{Elution}}$	60 mL
Äquilibration	4 Säulenvolumen mit Niedrigsalzpuffer
Flussrate	1.5 mL/min
Fraktionsgröße	1.5 mL
Gradient	0 – 1 M NaCl (1 M NaCl in Niedrigsalzpuffer)

### 2.9.8 Dialyse

Zum Austausch von Puffersubstanzen oder Entfernen von Salzen wurden Proteinlösungen bei 4°C ü.N. gegen das 200-fache Volumen der neuen Pufferlösung dialysiert. Bei großen Volumina (>15 mL) wurde ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze (MWCO) von 3500 Da verwendet (*Snake-skin Dialysis Membrane*, Pierce). Die für die Kristallisation eingesetzten Proteinlösungen wurden nach dem letzten Reinigungsschritt (GPC oder IEC) gegen das 200-fache Volumen des Kristallisationspuffers in einem Dialyserahmen (*Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette*, Pierce) ü.N. bei 4°C äquilibriert. Die MWCO der Dialysemembran wurde durch die Molekularmasse des Proteins bestimmt; die Größe des Dialyserahmens richtete sich nach dem Volumen der Proteinlösung.

### 2.9.9 Konzentrierung von Proteinen in Lösung

Bei Proteinkonzentrationen unter 10 mg/mL wurde die Proteinlösung mittels VivaSpin 20-Konzentratoren (20 mL Fassungsvermögen) nach Anweisung des Herstellers in einer Tischkühlzentrifuge konzentriert. Die Konzentrator-Einheiten besaßen eine Polyethersulfon- Membran mit einer MWCO von 5 kDa bzw. 10 kDa. Bei kleineren Volumina (< 2 mL) wurden VivaSpin 2-Konzentratoren (2 mL Fassungsvermögen) verwendet.

### 2.9.10 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-PAGE werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Molekularmasse im elektrischen Feld getrennt (Lämmli, 1970). Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine in einem großporigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem kleinporigen Trenngel der Größe nach getrennt. Folgende Lösungen wurden benötigt (Aufbewahrung bei 4°C):

#### Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösung (30 % : 0.8 %)

#### Sammelgel Puffer (Upper Tris):

Tris/HCl pH 6.8..... 0.5 M  
SDS..... 0.4 %

#### Laufpuffer (10 x):

Glycin ..... 144 g  
Tris/OH..... 30 g  
SDS (10 % w/v).....100 mL  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

#### Trenngel Puffer (Lower Tris):

Tris/HCl pH 8.8..... 1.5 M  
SDS ..... 0.4 %

#### Probenpuffer (8 x):

Tris/HCl pH 6.8..... 0.25 M  
SDS ..... 8 %  
Glycerin..... 40 %  
β-Mercaptoethanol ..... 20 %

**Tabelle 2.18: Puffer und Lösungen für 4 SDS-PAA-Gele**

Substanz	Sammelgel (4 %)	Trenngel (15 %)
H <sub>2</sub> O	4.5 mL	1.6 mL
Upper Tris	1.9 mL	-
Lower Tris	-	7.4 mL
PAA	0.9 mL	10 mL
APS (25 %)	30 µL	80 µL
SDS (10 %)	75 µL	200 µL
TEMED	15 µL	20 µL

Ammoniumpersulfat (APS; 25 % w/v) wurde in H<sub>2</sub>O angesetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die SDS-PAGE wurden die Proteine in SDS-Probenpuffer (Kap. 2.9.1) aufgenommen und 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 45 min in Minigel-Apparaturen (BioRad; München) bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel und einer Spannung zwischen 35-200 V.

Nach der Elektrophorese wurden die SDS-PAA-Gele in Färbelösung (0.25 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (w/v) Ethanol) durch kurzes Erhitzen in der

Mikrowelle gefärbt. Die Gele wurden mit Wasser gespült und bis zur Entfärbung (10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Ethanol) inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die Gele 1–2 h in Trocknerlösung (50 % (v/v) Methanol, 3 % (v/v) Glycerin) inkubiert und anschließend in einen Rahmen zwischen Zellophanfolien (*Gel Air Cellophane Support*, BioRad) gespannt und getrocknet.

### 2.9.11 Proteintransfer auf Membranen (*Blotting*)

Für den Proteintransfer aus SDS-PAA-Gelelen auf Membranen durch *Semidry-Elektroblotting* (Khyse-Anderson, 1984) wurde folgende Lösung benötigt:

Transferpuffer:

CAPS/NaOH pH 11 (100 mM) .....	10 mL
Methanol .....	10 mL
H <sub>2</sub> O .....	80 mL

Die Übertragung der Proteine aus einem SDS-PAA-Gel erfolgte auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran. Dazu wurde das Trenngel nach der SDS-PAGE für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 1 min in Methanol aktiviert und dann ebenfalls in den Transferpuffer überführt. Whatman-Filterpapier (2x) wurde ebenfalls 15 min in Transferpuffer getränkt und auf die Anodenplatte der Transferkammer platziert. Darüber wurde die Membran und anschließend das Gel luftblasenfrei geschichtet. Zwischen Gel und Kathodenplatte der Transferkammer wurde erneut Whatman-Papier gelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h. Nach Transferende wurde die Membran für anschließende Untersuchungen (immunologischer Nachweis von Proteinen, N-terminale Sequenzanalyse) weiter behandelt.

### 2.9.12 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der Nachweis von auf Membranen transferierten Proteinen erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper. Dazu wurde die Transfermembran für 1 h mit Blockierlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS) bei Raumtemperatur (RT) abgesättigt und ü.N. bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (Verdünnung: polyklonale Antikörper-Seren 1:10000, monoklonale Antikörper (Kulturüberstand) 1:3-Verdünnung in Blockierlösung). Zur Entfernung der ungebundenen primären Antikörper wurde die Membran nachfolgend 3 x für 5 min in PBS gewaschen und anschließend für 1-2 h bei RT mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (Verdünnung nach Herstellerangaben) inkubiert. Nach Entfernung ungebundener sekundärer Antikörper durch erneutes Waschen mit PBS (3 x 5 min) erfolgte die Nachweisreaktion mit dem *Lumi Light Western Blotting Substrate*-Kit (Roche) nach Herstellerangaben.

### 2.9.13 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

In einer homogenen Proteinlösung kann die Konzentration eines Proteins mit bekannter Aminosäuresequenz bestimmt werden (Gill & Hippel, 1989). Dazu wird die Absorption der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Der molekulare dekadische Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280}$  eines Proteins lässt sich nach folgender empirischer Gleichung berechnen:

$$\epsilon_{280} = (5690 \times n_{\text{Trp}} + 1280 \times n_{\text{Tyr}} + 60 \times n_{\text{Cys}}) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (\text{Gl. 1})$$

mit  $n_x$  = Anzahl der Aminosäuren des entsprechenden Proteins

Die Proteinkonzentration  $c_{\text{Protein}}$  berechnet sich aus dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$\text{mit } c [\text{mg/mL}] = (M_r \times \text{OD}_{280}) / (\epsilon_{\text{Protein}} \times d) \quad (\text{Gl. 2})$$

$d$  = Schichtdicke der Küvette in cm

$M_r$  = Molekulargewicht

### 2.9.14 N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen

Die N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen erfolgt durch wiederholten Edman-Abbau und anschließender Identifizierung der jeweils abgespaltenen Aminosäure.

Zur Probenvorbereitung für die N-terminale Sequenzanalyse von Proteinen wurden die Proteine in der SDS-PAGE getrennt, anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert (Kapitel 2.9.12) und mit Färbelösung (Kapitel 2.9.10) gefärbt. Die entsprechende Proteinbande wurde präzise aus der Membran ausgeschnitten, mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und getrocknet. Die Sequenzanalysen von Proteinen für diese Arbeit wurden von Frau R. Getzlaff (GBF) in einem automatisierten Prozess mittels Gasphasensequenzator (494 Protein Sequenzer, Applied Biosystem) durchgeführt.

### 2.9.15 Enzymatische Methoden

#### a) TTL-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Aktivität der TTL wurde der Einbau von radioaktiv-markiertem Tyrosin ( $\text{L}$ -[3,5- $^3\text{H}$ ]-Tyrosin, Amersham, 1 mCi/mL bzw. 48 Ci/mM) in  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Dimere bestimmt. Dazu wurden 50 ng des Proteins (ca. 5-10 mU, 1U entspricht der Inkorporation von 1 nmol  $\text{L}$ -Tyrosin in Tubulin/min) in einem speziellen Reaktionspuffer (Tabelle 2.19) mit 150  $\mu\text{g}$  mikrotubulärer Proteine und 20  $\mu\text{M}$   $\text{L}$ -[ $^3\text{H}$ ]-Tyrosin für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze (50  $\mu\text{L}$ ) wurden nach Inkubation auf Whatman 3MM Filterpapierstücke gleicher Größe übertragen und mit 10 %iger Essigsäure für 10 min bei RT fixiert. Das Filterpapier wurde zweimal mit



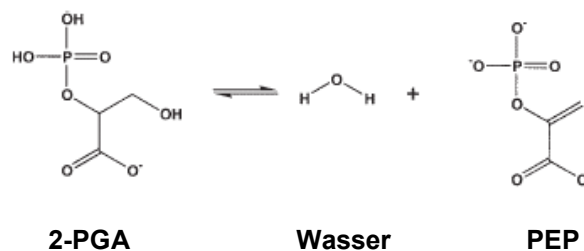
100 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Messung erfolgte in einem Szintillations-Zähler (Win Spectral 1414 Liquid Scintillation Counter, Wallac) nach Zugabe von jeweils 5 mL *Aqua luma* in Szintillations-Gefäßen.

**Tabelle 2.19: Zusammensetzung der Reaktionsansätze**

Lösung	Endkonzentration
5 µL 250 mM K <sup>+</sup> /MES, pH 6.8	25 mM
5 µL 1.5 M KCl	150 mM
5 µL 125 mM MgCl <sub>2</sub>	12.5 mM
2.5 µL 50 mM ATP	2.5 mM
0.5 µL 100 mM DTT	1 mM
5 µL Mikrotubuli	30 µg/µL
10 µL L-[3,5- <sup>3</sup> H]-Tyrosin	100 µM
1 µL TTL + 12 µL H <sub>2</sub> O	50 ng/µL

### b) $\alpha$ -Enolase-Aktivitätstest

Das rekombinante Protein  $\alpha$ -Enolase wurde in einem Enzymaktivitätstest auf die Fähigkeit zur Umsetzung des natürlichen Substrates 2-Phosphoglycerinsäure (2-PGA) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) untersucht.



**Abb. 2.1: Enolase-Reaktion**

Dazu wurden 5 µg Enolase in Reaktionspuffer (20 mM Hepes pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 7.7 mM KCl; Ansatz: 1 mL) mit verschiedenen Substrat-Konzentrationen (2-PGE) photometrisch vermessen. Das Produkt der Umsetzungsreaktion, Phosphoenolpyruvat, absorbiert UV-Licht bei einer Wellenlänge von 240 nm. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Enolase (1 mg/mL) zur Substratlösung in Reaktionspuffer gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde im Photometer bei 240 nm in 60 sec-Intervallen protokolliert. Die Ermittlung der Enzymparameter  $K_M$  und  $V_{max}$  erfolgten nach der Gleichung:

$$V = V_{max} [S] / [S] + K_M \quad (\text{Gl. 3})$$

mit  $V$  = Reaktionsgeschwindigkeit [ $\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$ ]  
 $V_{max}$  = Maximale Reaktionsgeschwindigkeit  
 $[S]$  = Substratkonzentration [ $\text{M}$ ]  
 $K_M$  = Michaelismentenkonstante [ $\text{M L}^{-1}$ ], Substratkonzentration bei halb- maximaler Reaktionsgeschwindigkeit

## 2.10 Molekularbiologische Methoden

### 2.10.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation mit dem *QIAprep Spin Miniprep Plasmid Kit* wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus *E. coli*-Zellen, die jeweils in 5 mL-Flüssigkulturen ü.N. bei 37°C und 180 UpM kultiviert worden waren. Die Plasmid-DNA wurde bei –20°C gelagert.

### 2.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in 50 µL Ansätzen durchgeführt und enthielt 1-100 ng DNA, je 10 mM dNTPs, je 10 pmol 5'- und 3'-Primer, 1 U Pfu-Polymerase (Roche, Mannheim) und 5 µL Polymerase-Reaktionspuffer (10fach). Die PCR-Zyklen wurden in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen) wie folgt durchgeführt: Zu Beginn 3 min Denaturierung bei 95°C, dann 25-30 Zyklen mit 95°C für 1 min Denaturierung, 42-68°C für 45 sec Anlagerung der Primer, 72°C für 1.5 min Synthese, abschließend für 5 min 72°C finale Synthese.

Die Anlagerungstemperatur wurde den entsprechenden Schmelztemperaturen der verwendeten sequenzspezifischen Oligonukleotide bei jeder Reaktion empirisch angepasst.

### 2.10.3 Ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Die Mutationen im entsprechenden Gen wurden in einer PCR-Reaktion unter Verwendung von sequenzspezifischen Oligonukleotiden eingeführt. Die Planung der Oligonukleotide und Durchführung der ortsgerechten Mutagenese erfolgte mit dem *QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach Anleitung des Herstellers.

### 2.10.4 Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

#### a) Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten wurde mit horizontaler Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Je nach Fragmentgröße wurden Gele mit 0.8-1.2 % Agarose verwendet. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (40 mM Tris/Base, pH 7.5, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA) verwendet. Zum Nachweis der DNA wurde Ethidiumbromid (12.5 µg/mL Agarose) verwendet. Die DNA wurde im Verhältnis 5:1 mit 5 x Ladepuffer (15 % (w/v) Ficoll, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, 0.4 % (w/v) SDS, 50 mM EDTA, pH 8.0 in TAE-Puffer) gemischt und bei 70-80 V bis zu 2 h getrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und photographiert bzw. isoliert.

### **b) Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

## **2.10.5 Enzymatische *in vitro*-Reaktionen an DNA**

### **a) Restriktion von DNA**

Plasmid-DNA (50 ng DNA) wurde für 2-4 h in den Reaktionspuffern der jeweiligen Enzyme nach Angaben des Herstellers gespalten. Die eingesetzte Enzymmenge betrug 1 U/ $\mu$ g DNA. Doppelhydrolysen erfolgten bei identischen Bedingungen gleichzeitig, bei unterschiedlichen Bedingungen nacheinander. Anschließend wurde zur Trennung der DNA-Fragmente die horizontale Agarosegelelektrophorese eingesetzt (Kap. 2.10.4.a).

### **b) Ligation**

Zur Ligation wurden Vektor-DNA und DNA-Fragmente in einem Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte unter Zugabe der T4-Ligase (1 U, Roche, Mannheim) für 4 h bei 20°C oder ü.N. bei 4°C in T4-Ligase-Reaktionspuffer.

## **2.11 Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen**

### **2.11.1 Oberflächen-Plasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR; BIAcore)**

Die Methode der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie ermöglicht die Untersuchung funktioneller Wechselwirkungen von Biomolekülen in Echtzeit, ohne dass dabei eine Markierung der Moleküle erfolgen muss (Fagerstam *et al.*, 1992; Silin & Plant, 1997). Bei dieser äußerst empfindlichen Technik können sehr geringe Konzentrationen der zu untersuchenden Biomoleküle ( $< 10^{-12}$  M) eingesetzt und Bindungen mit niedriger Affinität (bis ca. 100  $\mu$ M) erfasst werden. Das physikalische Prinzip der SPR-Technik beruht auf dem Phänomen der Totalen Internen Reflexion (TIR). Es tritt auf, wenn Licht in einem bestimmten Winkel auf die Grenzschicht zwischen einem dichten und einem weniger dichten Medium trifft. Der gesamte Lichtstrahl wird reflektiert und dringt nicht in das Medium ein. Da die Medien durch eine dünne Goldschicht getrennt sind, kommt es bei einem bestimmten Einfallswinkel (Resonanzwinkel) zu einer Resonanzkopplung zwischen dem eingestrahnten Licht und den Oberflächenatomen der Goldschicht. Bei konstanter Wellenlänge und Medien ist der Winkel, bei dem die Abnahme der Intensität des reflektierten Lichts erfolgt, direkt vom Refraktionsindex des Mediums von geringerer Dichte abhängig. Im BIAcore-System wird ein fokussierter monochromatischer Lichtstrahl (760 nm) an der Oberfläche eines mit Gold beschichteten Prismas reflektiert (Abb. 2.2). Der zu untersuchende Bindungspartner (Ligand) wird über eine Matrix, z.B. aus carboxymethyliertem Dextran (CM-

Dextran), kovalent an die vom Prisma abgewandte Seite der Goldschicht gebunden. Der andere Interaktionspartner (Analyt) wird mit einem Mikrofluss-System in die Meßzelle injiziert und unter gleichmäßigem Fluss über die Sensor-Oberfläche geleitet.

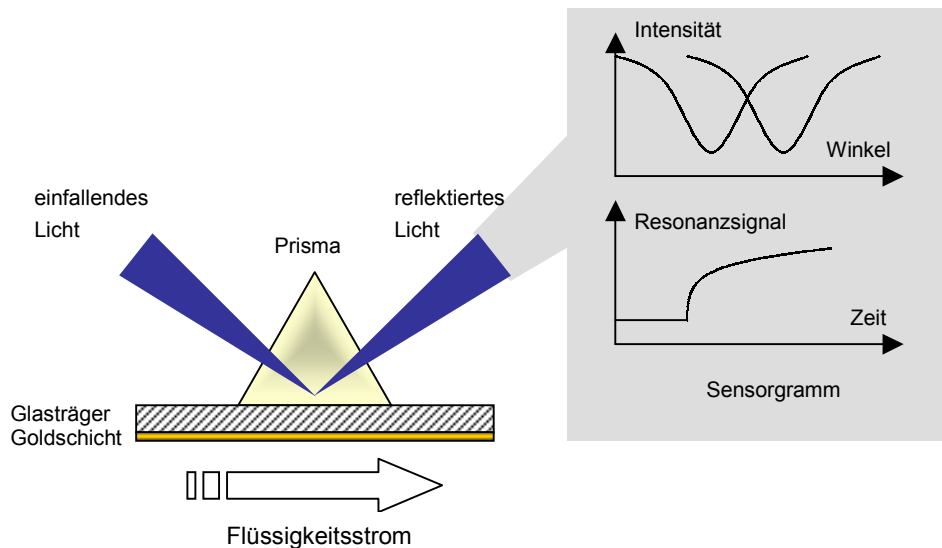


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der SPR-Methode im BIAcore-System (Details im Text)

Erfolgen biomolekulare Wechselwirkungen zwischen Ligand und Analyt, ändert dies die Schichtdicke der Goldoberfläche. Dies führt zu einer Differenz zwischen der Intensität des eingestrahnten und des reflektierten Lichts vor und nach der Interaktion (Veränderung des Winkels). Die Intensitätsdifferenz wird von einem Detektor (*charged-coupled device*, CCD) gemessen und in Form von Resonanzeinheiten (*resonance units*, RU) in einem Sensorgramm dargestellt, das in Echtzeit verfolgt werden kann. Dabei wird der Vorgang der Assoziation und der nachfolgenden Dissoziation der Biomoleküle erfasst (Abb.2.3).

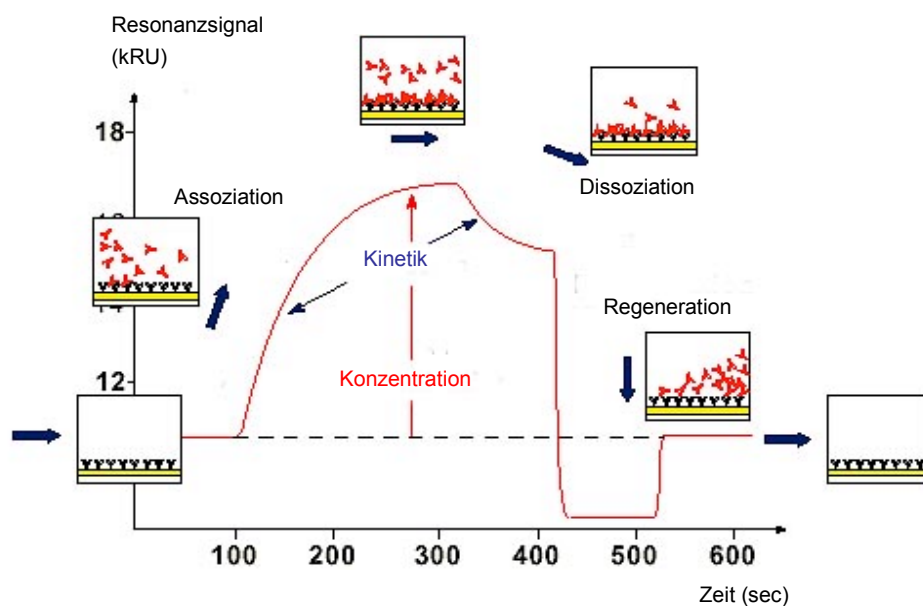


Abb. 2.3: Sensorgramm.

Aus der Kurvenform und der Konzentration des injizierten Analyten können die Kinetik und die Affinität zum Interaktionspartner abgeleitet werden. Während der Dissoziationsphase wird nur der Puffer injiziert. Um die Dissoziationsphase in Vorbereitung weiterer Messungen abzukürzen, kann der gebundene Analyt durch Injektion von Regenerationslösungen wieder vom Liganden entfernt werden.

Das in dieser Arbeit eingesetzte BIAcore-System besteht aus einem Sensorchip, einem optischen System zur Erzeugung und Nachweis des SPR-Signals und einem integrierten Mikrofluss-System (Kontrolle des Proben transports). Über einen Autosampler werden die Proben automatisch in das Fluss-System injiziert (Gerät: BIAcore 2000). Bei dem in diesen Studien verwendeten CM5-Sensorchip (BIAcore) kann die Immobilisierung des Liganden durch kovalente Bindungen über funktionelle Aminosäure-Gruppen ( $\text{NH}_2$ -,  $\text{SH}_2$ -,  $\text{CHO}$ - und  $\text{COOH}$ -Gruppen)) erfolgen.

Beispiel für eine qualitative Interaktionsanalyse. Während der Injektion des Analyten steigt das SPR-Signal deutlich an, was eine Bindung des Analyten (Assoziation) an den auf der Biosensor-Oberfläche immobilisierten Liganden anzeigt. Durch anschließende Injektion des Laufpuffers ohne Analyt wird die Dissoziation eingeleitet. Hierbei kommt es zu einem Abfall des SPR-Signals.

Die Beschichtung des Sensorchips mit gereinigten Proteinen, sowie die Durchführung der Messung, erfolgten nach Herstellerprotokoll. Als Laufpuffer wurde 10 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl (HBS-Puffer) mit einer Flussrate von 10-30  $\mu\text{L}/\text{min}$  verwendet. Die Auswertung kann, soweit möglich, durch BIAevaluation-Software 3.1 erfolgen.

Grundlage für die Evaluierung der Kinetikdaten mit der BIAcore-Software ist der Marquardt-Levenberg-Algorithmus. Der Algorithmus optimiert Parameterwerte durch Minimierung der Flächensummen bei fehlender Übereinstimmung der Sensorgramme zwischen den experimentellen und den errechneten Werten. Die Güte einer Kinetikanalyse wird anhand der optischen Übereinstimmung der theoretischen ermittelten Bindungskurven mit den Sensorgrammdaten des Versuchs ermittelt. Weiterhin ermöglicht die Bestimmung der Flächensummenabweichung  $\chi^2$  eine quantitative Abschätzung der Übereinstimmung der gemessenen Bindungsdaten mit den errechneten Werten des angewandten Kinetikmodells.

### 2.11.2 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Mit der Methode der Analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) wird die Bewegung oder Konzentrationsverteilung von biologischen oder synthetischen Makromolekülen in Lösung untersucht. Die AUZ misst die Masse bzw. Dichte von Partikeln anhand ihrer Sedimentation im Schwerfeld. Die primäre Messgröße ist der Sedimentationskoeffizient  $s$ , welcher angibt, wie schnell ein Partikel im normierten Schwerfeld um eine Längeneinheit sedimentiert. Der Sedimentationskoeffizient ist direkt aus den Messdaten zugänglich. Dies gilt auch für Proben, in denen mehrere Partikelspezies vorhanden sind (mehrmodale Gemische). Hier ermöglicht die AUZ zudem eine Bestimmung der Stöchiometrie bei Komplexbildungsprozessen. Neben Sedimentationskoeffizienten können auch thermodynamische Parameter wie z.B. Bindungskon-

zienten können auch thermodynamische Parameter wie z.B. Bindungskonstanten molekularer Interaktionen bestimmt werden. Daher ist die AUZ auch für die Charakterisierung reversibler Wechselwirkungen von Makromolekülen geeignet. Dazu gehören Studien von Enzym-Substrat-Bindungen, Rezeptor-Ligand-Komplexbildungen oder Nukleinsäure-Protein-Interaktionen. Ebenso kann mit Hilfe der AUZ die Selbstassoziation von Proteinen (Oligomerisierung) nachgewiesen werden.

### a) Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten

Die Bestimmung eines Sedimentationskoeffizienten ist ein Nicht-Gleichgewichtsverfahren. Dabei wird eine anfänglich homogene Lösung zentrifugiert, und es bildet sich mit der Zeit eine Grenzschicht zwischen der Lösung der sedimentierenden Partikel und dem freien Lösungsmittel aus. Aus der Wanderungsgeschwindigkeit der Grenzschicht kann der Sedimentationskoeffizient der Teilchen ermittelt werden:

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r} = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{N_L \cdot f} \quad (\text{Gl. 4})$$

$s$  = Sedimentationskoeffizient

$\rho$  = Dichte

$v$  = Geschwindigkeit der sedimentierenden Teilchen ( $dr/dt$ )

$r$  = Abstand vom Rotormittelpunkt

$N_L$  = Loschmidt-Konstante

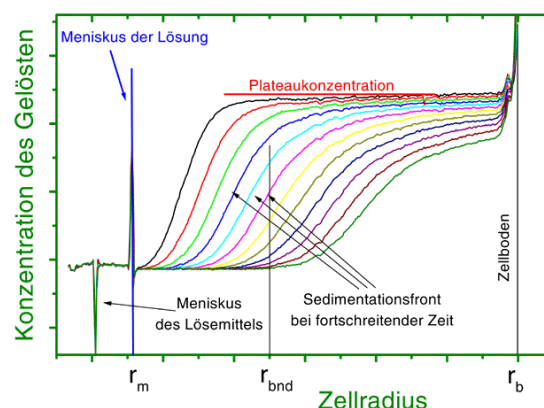
$\omega$  = Winkelgeschwindigkeit

$M$  = Molekulargewicht

$\bar{v}$  = partielles spezifisches Volumen

$f$  = Reibungskoeffizient

Bei der Bestimmung der Position der wandernden Grenzschicht treten jedoch häufig Probleme auf. Selbst bei einer einheitlich sedimentierenden Substanz wird die Grenzschicht durch Diffusion verbreitert sein und kann damit die Bestimmung der Position erschweren. In guter Näherung gilt jedoch, dass der Wendepunkt einer Auftragung der Konzentration gegen die Entfernung vom Rotormittelpunkt die Position der Grenzschicht darstellt (Abb.2.4).



**Abb.2.4: Sedimentationslauf der analytischen Ultrazentrifugation**

Die Grenzschicht in der anfänglich homogen gefüllten Zelle wandert von links nach rechts. Wegen der Diffusion verbreitert sie sich dabei. Aufgrund der Sektorform der Zelle und der mit der Entfernung vom Rotormittelpunkt zunehmenden Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen nimmt während der Zentrifugation die Konzentration im Plateaubereich ab.

Besteht die Probe aus mehreren Komponenten, so wird sich bei geringen Unterschieden im Sedimentationskoeffizienten zunächst nur eine außergewöhnliche Bandenverbreiterung einstellen. Bei größeren Differenzen des Sedimentationskoeffizienten erfolgt eine Trennung in mehrere Banden. Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe können auch zur Analyse von molekularen Wechselwirkungen eingesetzt werden. Bindet ein relativ kleines Molekül im Überschuss an ein größeres Molekül, so ergeben sich normalerweise nur zwei sedimentierende Banden: Eine langsam Wandernde für den Überschuss an kleinen Molekülen und eine schnell Wandernde für den Komplex und das freie, große Molekül.

Dies lässt sich vereinfacht dadurch erklären, dass in einem dynamischen Gleichgewicht das kleine Molekül immer wieder von dem Großen abdissoziiert, eine gewisse Strecke dann freie kleine und große Moleküle nebeneinander sedimentieren, um dann anschließend wieder in einem gemeinsamen Komplex zu wandern. Die Zeiten, in denen Dissoziations- bzw. Reassoziationsprozesse ablaufen, liegen in der Regel bei wenigen Sekunden. Die dazu gehörenden Sedimentationsstrecken sind, verglichen mit der Strecke der gesamten Sedimentation, demnach äußerst klein. Aus den Konzentrationsverhältnissen der wandernden Banden kann man die Gleichgewichtskonstante der Interaktion errechnen.

### **b) Durchführung der Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente**

Alle Sedimentationsgeschwindigkeits-Experimente wurden von Prof. C. Urbanke (Medizinische Hochschule Hannover) bei 40000 UpM und 20°C in einer Beckmann XL-A Ultrazentrifuge durchgeführt, die mit photoelektrischer Detektionsoptik und einem An50Ti-Rotor mit acht Positionen für Doppelsektorküvetten ausgestattet war.

Die Standard-Titrationsexperimente wurden mit verschiedenen Gemischen von Protein A und Protein B in unterschiedlichen molaren Verhältnissen durchgeführt. Nach dem Ansetzen der Gemische wurden die Proben sofort zentrifugiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte durch Prof. C. Urbanke.

## **2.12 1D-<sup>1</sup>H-NMR**

Bestimmte Atomkerne, wie etwa der des häufigsten Wasserstoff-Isotops <sup>1</sup>H, besitzen einen inneren Kernmagnetismus. Der atomare Eigendrehimpuls  $P$  des positiv geladenen Protons erzeugt, wie jeder rotierende elektrisch geladene Kerndipol, ein magnetisches Kernmoment  $\mu$ . Wird im Laborkoordinatensystem  $x,y,z$  ein homogenes externes Magnetfeld der Feldrichtung  $z$  angelegt, so kann die Vektorkomponente  $\mu_z$  des magnetischen Kernmoments  $\mu$  eine parallele ( $\alpha$ -Zustand) oder antiparallele ( $\beta$ -Zustand) Orientierung zur Feldrichtung  $z$  annehmen. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen ist der Flussdichte  $B_0$  des angelegten Feldes proportional. Ein Übergang vom tieferen  $\alpha$ - in den höheren  $\beta$ -Zustand wird dadurch möglich, dass der Kern aus einem elektromagnetischen Zusatzfeld  $B_1$  Strahlung geeigneter Frequenz absorbiert. Die Resonanzfrequenz  $\nu$  eines isolierten Kerns ist:

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi \quad (\text{Gl.5})$$

wobei  $\gamma$  eine für die verschiedenen Isotope und Kernsorten spezifische Proportionalitätskonstante (magnetogyrisches Verhältnis) ist. Die effektiv auf die einzelnen Kerne der Probe wirkenden Magnetfelder  $B_{\text{eff}}$  sind jedoch nicht identisch. Das externe Feld  $B_0$  induziert in den Elektronenhüllen der Kerne Elektronenströme und folglich entgegengerichtete Magnetfelder, welche die Kerne in Abhängigkeit von der jeweiligen lokalen Elektronendichte unterschiedlich stark gegen  $B_0$  abschirmen. Folglich absorbieren Kerne in unterschiedlicher chemischer Umgebung Energie bei geringfügig verschiedenen Resonanzfrequenzen, ein Effekt, den man chemische Verschiebung  $\delta$  nennt. Die Größe der chemischen Verschiebung  $\delta$  wird meist als dimensionslose Differenz der Resonanzfrequenzen der zu untersuchenden Substanz  $\nu_{\text{Sub}}$ , sowie einer geeigneten Referenzsubstanz  $\nu_{\text{Ref}}$ , in ppm der Senderfrequenz von  $B_1$  ausgedrückt. Auf der Abszisse wird  $\nu_{\text{Ref}}$  dann als Nullpunkt des Spektrums gesetzt. Alternativ ist auch die Kalibrierung des Spektrums am Lösungsmittel-Signal ( $\text{H}_2\text{O}$ ) möglich, wenn dessen Position bei gegebener Temperatur bekannt ist.

Mit einem 1D  $^1\text{H}$ -NMR-Experiment kann man qualitativ zwischen ungefalteten und gefalteten Proteinen unterscheiden (Rehm *et al.*, 2002). In ungefalteten Proteinen streuen die Signale spezifischer Kerne kaum um für die jeweiligen Aminosäurereste empirisch ermittelten *random coil*-/Standard-Verschiebungswerte. Auch die Resonanzfrequenzen gleichartiger Wasserstoffkerne aus verschiedenen Aminosäuren sind sich ähnlich, so dass sich die entsprechenden Signale in einem engen spektralen Bereich vielfach überlappen. So weisen z. B. überlappende, breite Peaks zwischen 8.4 und 8.1 ppm, der Region für die peptidischen Amid-Protonen (HN), auf ein ungefaltetes Protein hin. In gefalteten Proteinen treten die entsprechenden Signale in einem breiteren Bereich (etwa 9 bis 7.4 ppm) als gut getrennte, scharfe Linien in Erscheinung. Entsprechendes gilt für die Wasserstoffkerne am  $\text{C}_\alpha$ -Atom ( $\text{H}_\alpha$ ; ca. 5.4 bis 3.6 ppm) sowie für die Methyl-Protonen aliphatischer Seitenketten (1.4 bis -1 ppm), deren Signale sich in gefalteten Proteinen ebenfalls über ausgedehntere Spektralbereiche verteilen als in ungefalteten Proteinen.

In dieser Arbeit wurde die Methode angewendet, um die Proteinfaltung des rekombinanten Kringle 1-3 (K1-3) zu überprüfen. Zur Probenvorbereitung wurde K1-3 0.5 mM in 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen. Die 1D  $^1\text{H}$ -Kernresonanzspektren wurden von Dr. Victor Wray (GBF, Braunschweig) auf einem Bruker Avance DMX600 NMR-Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, DE) mit einem  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Tripelresonanz-Probenkopf mit Gradienteneinheit und externer Temperiereinheit (Haake GmbH, Karlsruhe, DE) bei 300 K aufgenommen. Die Prozessierung und Auswertung der Spektren erfolgte ebenfalls durch Dr. Victor Wray auf einer Hewlett Packard PC-Workstation mit dem Programm XWIN-NMR 3.1 (Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, DE) unter dem Betriebssystem Microsoft Windows 2000.

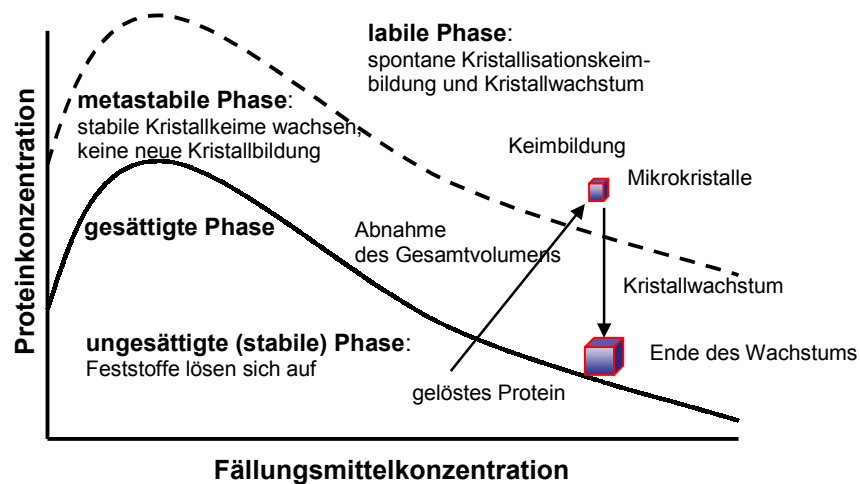


## 2.13 Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse ist derzeit die wichtigste Methode zur Aufklärung der Raumstruktur von Biomakromolekülen. Mit Hilfe der Kristallstruktur ist es z.B. möglich, den genauen Katalysemechanismus von Enzymen zu verstehen und Vorhersagen über mögliche Inhibitoren zu treffen. Bei medizinisch relevanten Enzymen können solche Inhibitoren zu Medikamenten weiterentwickelt werden (*drug design*). Darüber hinaus können spezifische Protein-Protein-Interaktionen durch die Aufklärung der Kristallstruktur auf atomarer Ebene ermittelt werden. Grundvoraussetzung für die Strukturaufklärung eines Proteins mittels Röntgenstrukturanalyse ist die Produktion hochgeordneter Einkristalle von ausreichender Größe ( $\geq 0.1$  mm) aus homogenen Proteinlösungen. Da die Kristallisationseigenschaften eines Proteins nicht vorhersagbar sind, müssen die Bedingungen empirisch ermittelt und anschließend optimiert werden. Für die Kristallqualität ist neben der Größe und dem Streuvermögen eine geringe Mosaizität (Unordnung durch unregelmäßige submakroskopische Anordnung im Kristall) ausschlaggebend.

### 2.13.1 Kristallisation von Proteinen

Die Kristallisation ist ein Vorgang, bei dem Proteinmoleküle aus einer übersättigten Lösung in einen festen Phasenzustand übergehen. Dazu wird eine hochkonzentrierte Proteinlösung mit einem Fällungsmittel versetzt. Mit zunehmender Fällungsmittelkonzentration wird die Löslichkeitsgrenze des Proteins überschritten und das System gelangt in einen übersättigten Zustand (Abb. 2.5).



**Abb.2.5: Theoretisches Phasendiagramm einer Proteinlösung unter Kristallisationsbedingungen**

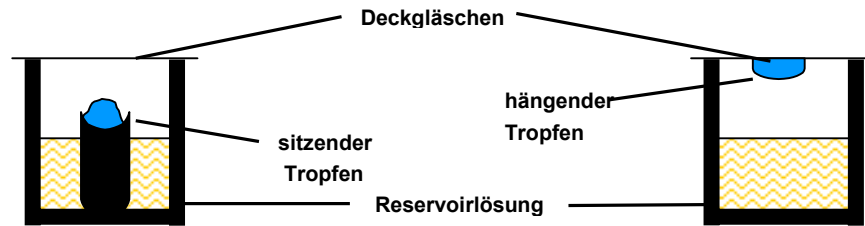
Typisches Löslichkeitsdiagramm für die Kristallisation aus Lösung mit labiler, metastabiler und untersättigter (stabiler) Phase. Die durchgezogene Linie repräsentiert die Sättigungsgrenze des Proteins in Lösung. Das Diagramm beschreibt die Proteinkristallisation durch die am weitesten verbreitete Methode, der Übersättigung durch Zugabe von Fällungsmittel. In der stabilen Phase sind ausschließlich freie Proteinmoleküle in Lösung. In der labilen Phase kommt es zur Kristallisationskeimbildung und deren Wachstum, während in der metastabilen Phase nur Kristallwachstum stattfindet.

Dieser besteht aus einer metastabilen und labilen Zone. Stabile Keime können nicht in der metastabilen Zone gebildet werden, bereits vorhandene Keime können jedoch wachsen. In der labilen Zone werden stabile Keime spontan gebildet, die weiter zu Kristallen wachsen oder aggregieren und als Niederschlag ausfallen. Ideal ist die Überführung in die labile Phase nahe der metastabilen Zone, wo sich wenige Keime bilden. Durch deren Wachstum nimmt die Proteinkonzentration ab und das System geht in die metastabile Phase zurück, in der die Keime zu Kristallen wachsen können (McPherson, 1999).

Am häufigsten werden Proteine nach dem Prinzip der Fällung kristallisiert. Hierbei handelt es sich um eine Übersättigung von Proteinen in wässrigen Lösungen durch Zugabe sogenannter Fällungsmittel. Als Fällungsmittel, die Proteine ab einer bestimmten Konzentration aus der Lösung drängen, eignen sich anorganische Salze, organische Lösungsmittel, Alkohole oder Polyethylenglykole unterschiedlicher Molekularmasse. Die Kristallisation der Proteine wird dabei durch langsame Zunahme der Fällungsmittelkonzentration bis in den Bereich der Übersättigung z. B. durch Dampfdiffusion (Verdunstung) in einem geschlossenen System erreicht. Sind bestimmte Fällungsmittel- und Proteinkonzentrationen erreicht, erzwingen diese Protein-Protein-Wechselwirkungen, die im Idealfall eine geordnete dreidimensionale Anordnung zum Proteinkristall bewirken. Um bei der Aggregation von Proteinen einen wohlgeordneten dreidimensionalen Kristall und keinen Niederschlag zu erhalten, muss der Prozess der Übersättigung sehr langsam ablaufen. Die Kristallisation wird von verschiedenen Parametern beeinflusst. Hierzu gehören die Konzentration des Proteins, das möglichst in einer reinen und homogenen Form vorliegen muss, die Temperatur, Art und Konzentration des Fällungsmittels, sowie die Ionenstärke und der pH-Wert. Über die Variation des pH-Wertes können für polare Wechselwirkungen wichtige Ladungen auf der Proteinoberfläche erzeugt werden (McPherson, 1999; Ducruix & Giegé, 1992).

### **a) Kristallisation durch Dampfdiffusion**

Zur langsamen Erhöhung der Konzentration von Protein und Fällungsmittel wurde in dieser Arbeit die Methode der Proteinfällung durch Diffusion über die gasförmige Phase verwendet. Dabei wird eine konzentrierte Proteinlösung mit einer Fällungsmittellösung zu einem Tropfen vermischt und räumlich von einer Lösung getrennt, die das gleiche Fällungsmittel wie der Tropfen enthält (Davies & Segal, 1971; Hampel *et al.*, 1968; Weber, 1997). Bei den zwei gebräuchlichsten Optionen der Dampfdiffusion sitzt der Tropfen entweder auf einer Erhöhung über einer mit der Fällungsmittellösung gefüllten Vertiefung (Reservoir) (*sitting drop*, sitzender Tropfen) oder wird auf einem Trägermaterial über die Reservoirlösung gehängt (*hanging drop*, hängender Tropfen). Die Öffnung der Kristallisationskammer wird anschließend luftdicht abgeschlossen (Abb. 2.6).



**Abb. 2.6:** Proteinkristallisation nach der Methode des sitzenden (links) und des hängenden Tropfens (rechts).

Das Volumen der Reservoirlösung ist um mehrere Größenordnungen höher als das Volumen des Tropfens. Da die Fällungsmittelkonzentration im Tropfen geringer ist als in der Reservoirlösung, entsteht ein Konzentrationsgefälle. Der unterschiedliche Dampfdruck beider Lösungen in der abgeschlossenen Kristallisationskammer resultiert in einem Konzentrationsausgleich über die Dampfphase (Dampfdiffusion).

Die Fällungsmittelkonzentration im Tropfen erhöht sich entweder durch langsame Diffusion von Wasser aus der Proteinlösung in die Reservoirlösung oder durch Diffusion von Fällungsmittel aus dem Reservoir in die Proteinlösung. Das Volumen des Tropfens nimmt ab, und die Konzentration von Protein und Fällungsmittel in dem Tropfen steigt an. Im Idealfall erfolgen eine Keimbildung und Kristallisation des Proteins. Die Praxis der Proteinkristallisation wurde von Ducruix & Giegé (1992) und McPherson (1999) im Detail beschrieben.

## b) Kristallisationsexperimente

Für Kristallisationsexperimente nach der Methode des sitzenden Tropfens wurden *Crystal Clear Strips* (Reservoir: 100  $\mu$ L; Hampton Research) verwendet. Auf der Erhöhung in der Reservoirkammer wurden je 3  $\mu$ L der konzentrierten, zentrifugierten Proteinlösung (5-15 mg/mL) mit 3  $\mu$ L Fällungsmittel vermischt (50 % Vorsättigung). Die Kristallisationskammern wurden anschließend mit durchsichtigem Klebeband luftdicht verschlossen.

Bei Kristallisationsexperimenten nach der Methode des hängenden Tropfens wurde die konzentrierte Proteinlösung (3  $\mu$ L; 5-15 mg/mL) auf einem zuvor silikonisierten Deckgläschen mit dem gleichen Volumen Fällungsmittels vermischt. Das Deckgläschen mit dem Tropfen wurde umgedreht und über mit Fällungsmittel (0.5-1 mL) gefüllte Vertiefungen von *Limbro*-Kristallisationsschalen mit angerauten Reservoirrändern gesetzt, die zuvor mit Silikonöl beschichtet wurden, um einen Gasaustausch zu verhindern.

Die Kombination von multifaktoriellen Kristallisations-Screenings (Jancarik & Kim, 1991) mit der Methode des sitzenden Tropfens in *Crystal Clear Strips* erlaubt die Variation einer Vielzahl von Parametern wie pH-Wert, Puffer, Ionenstärke und Fällungsmittel bei geringem Proteinverbrauch. In dieser Arbeit wurden Screening-Kits der Firmen Hampton Research (*Crystal Screen I + II*, 98 Lösungen), Emerald Biostructures (*Wizard Screen I + II*, 96 Lösungen) und Jena Bioscience (*JBC Screen I-X*, 240 Lösungen) verwendet (Zusammensetzung siehe Herstelleran-

gaben). Zur Verbesserung der Kristallqualität wurden die *Additive Screens* I–III und *Detergent Screens* I–III (Hampton Research) nach Herstellervorschrift eingesetzt. Um unspezifische Protein-Oligomerisierungen zu unterbinden, wurden sowohl zu den Reservoirlösungen als auch zu den Proteinlösungen 5–10 mM DTT zugegeben. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Kristallisationsansätze bei 20°C gelagert und in regelmäßigen Abständen unter dem Polarisationsmikroskop auf Proteinkristalle untersucht.

### c) Kokristallisationsexperimente

Für Kokristallisationsexperimente von TTL mit ATP bzw. deren Derivate wurde direkt vor der Kristallisation TTL mit 5–15 mM ATP/ATP-Analoga vermischt und zur Kristallisation eingesetzt. Für Kokristallisationsexperimente von TTL mit Tubulin (bzw.  $\alpha$ -Enolase mit Plasminogen) wurden zum einen die Proteine in einem molaren Verhältnis 1:1 vermischt und zur Kristallisation eingesetzt (10–15 mg/mL Proteinlösung). Zum anderen wurden beide Proteine im molaren Verhältnis von 1:1 vermischt und zur Entfernung eventueller Verunreinigungen durch Oligomere zusätzlich durch Gelpermeationschromatographie (Superdex 200 *prep grade*) als Komplex isoliert, konzentriert (10–15 mg/mL) und zur Kristallisation eingesetzt.

### 2.13.2 Kristalle, Kristallstrukturanalyse und Datensammlung

Proteinkristalle können von unterschiedlicher Form und Größe sein. Sie bestehen aus einer Vielzahl von Elementarzellen, die durch wiederholte Translation entlang ihrer Kanten das gesamte Kristallgitter aufbauen. Aufgrund interner Symmetrie kann die Elementarzelle durch eine kleinere, sogenannte asymmetrische Einheit beschrieben werden, die durch Anwendung der Symmetrioperationen der Elementarzelle ergibt. Die Kombination der Gittertypen mit den möglichen Punktsymmetrioperationen ergibt die Raumgruppen. Von 230 in 14 Kristallsystemen sind für Proteine nur 65 Raumgruppen möglich, da Proteine aus chiralen Molekülen, den L-Aminosäuren, bestehen und somit Spiegel- oder Inversionssymmetrien nicht möglich sind.

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins kann durch die Röntgen-Kristallographie ermittelt werden. Trifft ein Röntgenstrahl auf einen Kristall, so wechselwirkt ein Teil des Primärstrahls mit der Elektronenhülle der Atome im Kristall, wodurch diese angeregt werden. Bei der Rückkehr der angeregten Elektronen in den Grundzustand wird Röntgenstrahlung in alle Richtungen abgegeben. Weil sich die Atome in einer regelmäßigen, sich wiederholenden, räumlichen Anordnung im Kristallgitter befinden, kommt es zur Interferenz der emittierten Röntgenstrahlung, die entweder zur Auslöschung oder in bestimmten Richtungen zur Verstärkung führt. Die Richtung des gebeugten Strahls ist dabei vom kristallinen Gitter abhängig.

Die Kristalle wurden zur Datensammlung auf einem Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls mit der Rotationsachse montiert. Die Erzeugung der Röntgenstrahlung erfolgte durch einen Röntgengenerator. Die, von einer rotierenden Kupferanode, emittierte  $K_{\alpha}$ -Strahlung ( $\lambda =$

1.5418 Å) wurde mit einem beugenden Spiegelsystem (*Osmic Confocal Optics*, Rigaku MSC) und einem Kollimator parallelisiert, und an dem auf einem Goniometerkopf montierten Proteinkristall gebeugt. Während der Datensammlung wurden durch Drehen des Kristalls um die Spindelachse, bis auf einen kleinen „toten“ Bereich, alle Gitterebenen in Diffraktionsposition gebracht. Die gebeugten Strahlen wurden mit einem elektronischen Flächendetektor im Abstand von 10-20 cm vom Kristall aufgenommen und gespeichert. In Abhängigkeit der Röntgenquelle und der Kristallqualität werden die Daten in unterschiedlicher Zeit eingelesen, bevor die nächste Position eingestellt wird und ein weiterer „Daten-frame“ aufgenommen wird. Auf diese Weise wurde sukzessiv ein Datensatz, bestehend aus der Gesamtheit der gemessenen *frames*, gesammelt. Der für die Vollständigkeit eines Datensatzes abzudeckende Winkelbereich hängt von der Symmetrie des Kristalls und von seiner Anfangsorientierung zur Strahlrichtung ab. Je höher die Kristallsymmetrie, desto geringer der erforderliche Rotationsbereich.

Die Indizierung der Reflexe zweier Beugungsbilder ( $\Delta\phi = 0.5^\circ$ ,  $\phi = 0^\circ/90^\circ$ ), sowie die Bestimmung der Raumgruppe, der Zellparameter und der Orientierung des Kristalls in Bezug auf die Laborkoordinaten aus dem reziproken Gitter, erfolgte mit dem Programm *DENZO* (Otwinowski, 1993). Zur Bestimmung der optimalen Mess-Strategie für die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes wurde die Routine *STRATEGY* des Programms *MOSFLM* (Leslie, 1992) eingesetzt. Raumgruppe, Kristallorientierung, Reflexgröße und die Mosaizität müssen bekannt sein, damit die Ergebnisse der Strategiesuche zutreffen.

In der GBF standen neben dem Programm *MOSFLM* (Leslie, 1992) auch das Programm *CRYSTAL CLEAR*, sowie das *HKL*-Programmpaket, zur Auswertung der aufgezeichneten Reflexe zur Verfügung (Otwinowski, 1993). Das *HKL*-Programmpaket wurde für die Datenprozessierung eingesetzt und enthält folgende Unterprogramme:

***XDISPLAYF***: Mit diesem Programm, zur optischen Darstellung von Diffraktionsaufnahmen und berechneten Diffraktionsmustern, erfolgte die Reflexsuche. Zusätzlich wurde die durch *DENZO* durchgeführte Indizierung und die Verfeinerung visuell überprüft.

***DENZO***: Dieses Programm indiziert die identifizierten Reflexe einer Aufnahme und verfeinert verschiedene experimentelle Parameter wie die Kristallorientierung, die Lage des Primärstrahls, die Länge der Gitterachsen, die Gitterwinkel und die Detektorausrichtung (Verdrehung, Verdrillung, Verkipfung), bis das Reflexmuster geometrisch geklärt ist. Danach werden die einzelnen Diffraktionsmaxima integriert. Nicht verfeinert, aber iterativ angepasst wird die Mosaizität und die mittlere Größe der Reflexe auf dem Detektor. Anschließend erfolgt eine Integration der einzelnen Diffraktionsmaxima.

***SCALEPACK***: Dieses Unterprogramm ermittelt die relativen Skalierungsfaktoren unterschiedlicher Beugungsaufnahmen zueinander und verfeinert die Kristallparameter unter Verwendung des gesamten Datensatzes. Anschließend wird die Vollständigkeit des Datensatzes, sowie die Redundanz der Reflexe, in den einzelnen Auflösungsschalen analysiert. Durch die Bestimmung des linearen  $R_{\text{sym}}$ -Wertes in den einzelnen Schalen kann die Qualität der Messung beurteilt werden (Gl. 6).

$$R_{sym} = \frac{\sum_n |I_{hkl(n)} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_n |I_{hkl(n)}|} \quad (\text{Gl. 6})$$

$I_{hkl(n)}$ : Intensität der n-ten Messung des Reflexes hkl (inklusive aller symmetrieäquivalenten Reflexe);  $\langle I_{hkl} \rangle$ : mittlere Intensität des Reflexes hkl

Für die optimale Datenprozessierung ist eine möglichst exakte Abschätzung des Messfehlers in den einzelnen Auflösungsschalen erforderlich. Die  $\chi^2$ -Verteilung (Gl. 7) ist ein wichtiges Kriterium für die genaue Ermittlung des geschätzten Fehlers und nimmt bei guter Fehlerschätzung Werte von ca. 1.0 an.

$$\chi^2 = \frac{\sum_n |I_{hkl(n)} - \langle I_{hkl} \rangle|^2}{\sum E^2 \frac{n}{n-1}} \quad (\text{Gl. 7})$$

$E$ : geschätzter Fehler der Messungen

Aus den Intensitäten und ihren Standardabweichungen wurden dann mit dem Programm *TRUNCATE* (*CCP4* suite; Programmsammlung für makromolekulare Kristallographie; [www.dl.ac.uk/CCP/CCP](http://www.dl.ac.uk/CCP/CCP)) Strukturamplituden und ihre Standardabweichungen berechnet.

### 2.13.3 Kryokristallographie

Beim Bestrahlen von Kristallen mit intensiver Röntgenstrahlung kommt es zu Strahlungsschäden. Hierbei wird zwischen primären und sekundären Strahlenschäden unterschieden. Primäre Strahlenschäden entstehen direkt, wenn Bindungen am Protein oder den umgebenden Lösungsmittelmolekülen gespalten werden. Von sekundären Strahlenschäden spricht man, wenn bewegliche Radikale entstehen, die weitere Reaktionen an Protein- und Wassermolekülen auslösen können (Garman & Schneider, 1997). Sekundäre Strahlenschäden können durch das Herabsetzen der Diffusion mittels Kühlung der Kristalle stark reduziert werden. Dafür werden Kristalle während der Messung in einem Stickstoffstrahl (100 K) gekühlt (Garman & Schneider, 1997).

Voraussetzung für die Kryokristallographie ist, eine Bedingung zu finden, unter der es möglich ist, Kristalle auf o.g. Temperatur unter möglichst geringer Zunahme der Mosaizität zu kühlen. Dabei sollte die den Kristall umgebende Flüssigkeit (Kryoschutzmittel) glasartig, also im Zustand einer unterkühlten Flüssigkeit erstarren. Bei milchiger Trübung muss die Konzentration des Kryoschutzmittels verändert werden. Als Kryoschutzmittel eignen sich niedere Alkohole (MPD, Glycerin, PEG 400/600), hochkonzentrierte Salzlösungen (Na-Malonat) oder Saccharide. Kryoschutzlösungen enthalten zusätzlich zu den Bestandteilen der Mutterlösung Kryoschutzmittel, deren Art und Konzentration für jeden Kristall und jede Mutterlösung experimentell bestimmt werden muss.

### 2.13.4 Bestimmung der Raumstruktur

Die zur Berechnung der Elektronendichtekarte nötige Phaseninformation kann im Falle von Protein-Kristallen nicht direkt anhand der Beugungsdaten bestimmt werden. Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass die Datenaufzeichnung nicht zeitempfindlich ist und daher nur ein zeitlicher Mittelwert der am Detektor eintreffenden Intensitäten erfasst werden kann. Das Phasenproblem ist gelöst, wenn die Koordinaten aller Streuzentren in der Elementarzelle bekannt sind. Falls die zu bestimmende Struktur einer bekannten Struktur sehr ähnlich ist, kann mit Hilfe dieser eine Abschätzung der Phasenwinkel berechnet werden (*Molecular Replacement*, MR). Bei einer „neuen“ Struktur werden Schweratome an definierten Positionen an jedes Proteinmolekül im Kristall gebracht (Derivatisierung). Aus den Differenzen der gemessenen Intensitäten unbehandelter und mehrerer derivatisierter Kristalle wird ein erster Phasensatz berechnet (Multipler Isomorpher Ersatz, MIR). Dafür werden native Kristalle in schweratomhaltige Lösungen überführt (*soaking*) oder sie werden direkt aus solchen Lösungen gezüchtet. Im Idealfall binden die Schweratome an symmetrisch identische Positionen am Protein im Kristall. Hierbei ist entscheidend, dass sich die Packung und Struktur der Proteine nicht verändert (Isomorphie). Unterschiede treten in den Intensitäten der Reflexe aufgrund der durch die Schweratome zusätzlich eingebrachten Elektronendichten auf. Zur eindeutigen Bestimmung der Phasen sind meist mehrere Derivate unterschiedlicher Schweratomposition nötig. Statt mehrerer Derivate kann auch das anomale Signal des gebundenen Metalls eines Derivates als zusätzliche Information genutzt werden (*Single Isomorphous Replacement with Anomalous Signal*, SIRAS).

Eine weitere Methode der Phasenbestimmung beruht auf der anomalen Dispersion bei verschiedenen Wellenlängen (*Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*, MAD). Normalerweise sind die Intensitäten der zwei Reflexe  $I(h, k, l)$  und  $I(-h, -k, -l)$ , die durch Inversionssymmetrie miteinander verknüpft sind und als Friedel-Paar bezeichnet werden, identisch (Friedelsches Gesetz). Die Anwesenheit von Schweratomen im Kristall kann dazu führen, dass sich die Intensitäten der Friedel-Paare unterscheiden. Dies wird als anomale Dispersion bezeichnet. Liegt das Röntgenabsorptionsmaximum des Schweratoms in der Nähe der Wellenlänge des Röntgenstrahls, kommt es zur Mitwirkung der inneren Elektronen am Streuvorgang und so zur anomalen Dispersion durch eine Phasenverschiebung. Aus den auftretenden Intensitätsverschiebungen zwischen den Friedel-Paaren lässt sich die Phaseninformation ableiten. Da Drehanoden-Röntgengeneratoren nur eine feste Wellenlänge erzeugen, muss zur Messung eines anomalen Signals Synchrotronstrahlung (variable Wellenlänge 0.3-4 Å) verwendet werden.

#### a) Molekularer Ersatz (MR)

Existiert eine zur Zielstruktur verwandte Struktur (z.B. ein strukturell homologes Protein), kann die Zielstruktur mit der Methode des molekularen Ersatz (MR) gelöst werden. Proteine mit einer Sequenzidentität von mehr als 20% weisen eine meist ähnliche räumliche Struktur auf (Sander & Schneider, 1991). Aus den Koordinaten der bekannten Struktur können die Strukturfaktoramplituden ( $F_{calc}$ ) und die Phasen für das Modell berechnet werden. Normalerweise unterscheiden sich

sowohl Raumgruppe als auch die Orientierung des Proteins in der bekannten und der unbekannten Kristallstruktur. Daher muss das bekannte Suchmodell erst in der neuen Elementarzelle korrekt platziert werden. Bei dieser Methode wird das Suchmodell unter Anpassung von drei Rotationswinkeln und drei Translationsvektoren mit der verwandten Struktur in Übereinstimmung gebracht (Rossmann & Blow, 1962). Die Rotationssuche dient der korrekten Orientierung des Suchmodells im Kristallgitter. Dies wird durch den Vergleich der Patterson-Funktion erreicht, die eine wird aus den Strukturfaktoramplituden ( $F_{\text{obs}}$ ) der gemessenen Beugungsintensitäten und die andere aus den  $F_{\text{calc}}$  des Suchmodells berechnet. Die zwei Sätze von Patterson-Vektoren werden dann durch eine Produktfunktion miteinander korreliert, wobei ein Vektorsatz  $P_1$  gegen den anderen  $P_2$  in kleinen Winkelschritten um alle drei Achsen gedreht wird (Rotationsfunktion Gl. 8).

$$R(C) = \int_U P_1(x) \cdot P_2(x') dV \quad (\text{Gl. 8})$$

$R(C)$  ist die Rotationsfunktion,  $C$  eine Matrix, die eine Rotation von Molekül  $x$  relativ zu  $x'$  definiert und  $U$  ist das Volumen über das integriert wird. Dieses Integrationsvolumen wird durch den Pattersonradius bestimmt. Er sollte möglichst im Bereich des Molekülradius liegen, so dass die Pattersonfunktion keine intermolekularen Atomabstände enthält, welche das Signal/Rauschverhältnis verschlechtern. Nach dem Auffinden der richtigen Rotationsorientierung wird das Suchmodell in Schritten von 1 Å durch die Einheitszelle bewegt (Translationssuche). An jedem Punkt wird die Korrelation der aus dem Modell berechneten Intensitäten und Abstandsvektoren mit denen der unbekannten Struktur verglichen. Zur Strukturaufklärung der  $\alpha$ -Enolase mittels MR wurden in dieser Arbeit die Programme *EPMR* (Kissinger *et al.*, 1999) und *CNS* (Brünger *et al.*, 1998) verwendet.

## b) Modellbau und Strukturverfeinerung

Die aus den gemessenen Intensitäten und kalkulierten Phasen berechnete Elektronendichtekarte wurde mit dem Programm *O* interpretiert (Jones *et al.*, 1991). Es wird die Elektronendichte von bereits korrekt eingebauten und noch fehlenden Strukturelementen dargestellt. Bereiche des Proteinmoleküls, die nicht mit der berechneten Elektronendichtekarte übereinstimmen, wurden durch Einpassen eines Polypeptidrückgrates aus Alanin-Resten modelliert und anschließend durch die der AS-Sequenz entsprechende AS ersetzt. Die Anpassung des unverfeinerten Strukturmodells an stereochemische Parameter erfolgte mit dem Programm *REFMAC* (Murshudov *et al.*, 1997). Hierbei wird die Qualität einer Modellstruktur durch zyklische Änderungen des Modells und nachfolgende Verfeinerung verbessert. Die Qualitätskontrolle der jeweiligen Verfeinerungszyklen erfolgte mit dem Programm *WHATIF* (Vriend *et al.*, 1990).

Beim Verfeinerungsprozess wird versucht die Differenz zwischen den experimentell beobachteten Strukturfaktoramplituden ( $F_{\text{obs}}$ ) und den von dem aktuellen Modell berechneten  $F_{\text{calc}}$  zu minimieren und gleichzeitig ein chemisch sinnvolles Modell zu erhalten. Die Verfeinerungspro-



gramme berechnen dabei verschiedene Energien, die z.B. die Abweichungen von den idealen Bindungsgeometrien, von nichtkovalenten chemischen Interaktionen, wie Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen, oder die Differenz zwischen  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  beschreiben und versuchen diese Energieterme zu minimieren.

Zur Beurteilung der Qualität der verfeinerten Struktur wurde der kristallographische R-Faktor  $R_{work}$  herangezogen, der die Übereinstimmung zwischen  $F_{obs}$  und  $F_{calc}$  des Reflexes  $h$  ausdrückt:

$$R_{work} = \sum_h \|F_{obs}(h) - F_{calc}(h)\| / \sum_h |F_{obs}(h)| \quad (\text{Gl. 9})$$

Um die Qualität einer Struktur, unabhängig von der Verfeinerungsmethode, verfolgen zu können, wurde der sogenannte freie R-Faktor eingeführt. Dieser wird ebenso wie  $R_{work}$ , aber nur mit etwa 10 % der gemessenen Reflexe, die nicht für die Strukturverfeinerung verwendet wurden, berechnet. Durch diese Kreuzvalidierung kann die Strukturverfeinerung besser kontrolliert werden (Brünger, 1992).

Mit den Verfeinerungsprogrammen können verschiedene Methoden zur sukzessiven Verbesserung der Modellstruktur genutzt werden. Die *simulated annealing*-Methode stellt dafür eine effiziente Verfeinerungsmethode dar. Hier wird die Proteinstruktur virtuell erhitzt und unter bestimmten Randbedingungen wieder abgekühlt. Aufgrund der hohen mittleren kinetischen Energie der einzelnen Atome bietet dieses Verfahren die Möglichkeit, lokale Energieminima zu verlassen, wodurch der Konvergenzradius entscheidend vergrößert wird. In den Verfeinerungszyklen mit *WHATIF* und *REFMAC* wurde zunächst die Stereochemie des jeweiligen Proteinmodells geprüft und durch eine Torsionswinkelverfeinerung verbessert. Dabei wurden durch eine Lösungsmittelkorrektur (*bulk solvent correction*) die Strukturfaktoramplituden der ungeordneten Wassermoleküle unter Annahme einer durchschnittlichen Elektronendichte berücksichtigt.

### c) Qualitätskriterien für Proteinstrukturen

**Ramachandran-Plot:** Diese Konformationsanalyse ist ein wichtiges Kriterium zur Qualitätsabschätzung. Die dihedralen Hauptkettenwinkel  $\phi$  und  $\psi$  um das  $C_\alpha$ -Kohlenstoffatom weisen für die verschiedenen Sekundärstrukturelemente charakteristische Werte auf, die durch die Stereochemie und eine energieminierte Konformation bestimmt werden (Ramachandran & Sasisecharan, 1968). Bei einem guten Proteinmodell sollten die Hauptkettenwinkel weitestgehend im energetisch günstigsten Bereich liegen. Diese Werte können graphisch im Ramachandran-Plot dargestellt werden. Diese Art der zweidimensionalen Darstellung erlaubt eine rasche Konformationsanalyse von Proteinstrukturen.

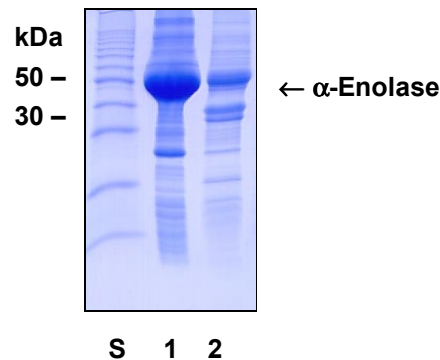
**Stereochemische Parameter:** Die Überprüfung der Proteinstruktur auf Abweichungen von Idealwerten der unterschiedlichen Parameter, wie Bindungslängen und -winkeln, Planarität bestimmter Atomgruppen u.a., ist für die Einschätzung der stereochemischen Qualität eines Proteinmodells bedeutend (Morris *et al.*, 1992). Entsprechende Konformationsanalysen können durch die Programme *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993) oder *WHATIF* (Vriend, 1990) ausgeführt werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die $\alpha$ -Enolase aus *Streptococcus pneumoniae* als Plasminogen-Bindeprotein

##### 3.1.1 Produktion und Reinigung der $\alpha$ -Enolase

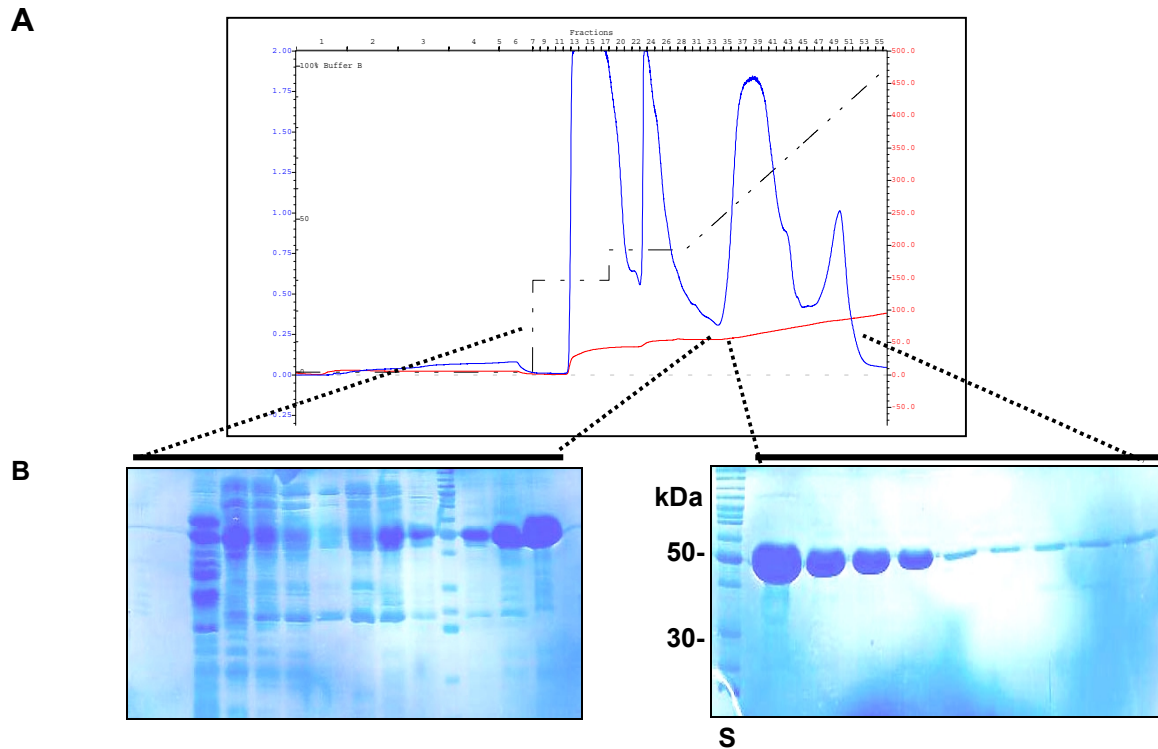
Trotz Expression der  $\alpha$ -Enolase als Fusionsprotein mit einem N-terminalem His<sub>6</sub>-Anker, zeigte das Fusionsprotein nicht die erwartete Affinität für Ni-NTA (Bergmann, S., persönliche Mitteilung). Der Grund dafür liegt vermutlich darin, dass der N-Terminus des Proteins im gefalteten Zustand verborgen ist. Aus diesem Grund wurde ein neues Reinigungsprotokoll für die  $\alpha$ -Enolase entwickelt. Die heterologe Produktion des His<sub>6</sub>- $\alpha$ -Enolase-Fusionsproteins erfolgte in dem Stamm *E.coli* M15 [pREP 4]. Die größte Ausbeute an löslicher  $\alpha$ -Enolase wurde nach 20 h bei 30°C und Induktion unter Verwendung von 0.1 mM IPTG produziert (Abbildung 3.1).



**Abb. 3.1: Produktion von  $\alpha$ -Enolase in *E.coli* M15 [pREP 4]**

Die Produktion der  $\alpha$ -Enolase wurde durch Zugabe von 0.1 mM IPTG induziert und 20 h bei 30°C kultiviert. Nach Aufschluss der Zellen wurden lösliche und unlösliche Proteine getrennt. S: Molekulargewichtsmarker, 1: lösliche Proteine, 2: unlösliche Proteine.

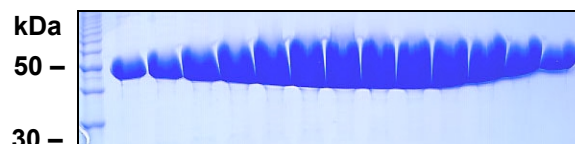
Die lösliche Proteinfraction (klarer Überstand des *E.coli*-Zellextraktes nach Zentrifugation) wurde zunächst mittels einer selbstgepackten Q-Sepharose-Säule (schwacher Anionenaustauscher) vorgereinigt.  $\alpha$ -Enolase-Fractionen wurden vereinigt und verbleibende Verunreinigungen durch eine weitere Anionenaustauschchromatographie (MonoQ HR 10/10) unter Anwendung eines Stufengradienten entfernt (Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2: Reinigung der  $\alpha$ -Enolase mittels Anionenaustauschchromatographie**

**A:** Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie von  $\alpha$ -Enolase. Das durch Q-Sepharose vorgereinigte Protein wurde nach Dialyse gegen Puffersalzpuffer (20 mM Hepes pH 7.5) auf eine Anionenaustauschchromatographie-Säule (MonoQ HR 10/10) geladen und durch einen Stufengradienten (schwarz: theoretisch; rot: gemessen; Stufe 1: 30 % NaCl für 15 mL, Stufe 2: 40 % für 15 mL, Stufe 3: linearer Gradient von 40-100 % NaCl in 50 mL) unter Messung der  $A_{280}$  (blau) eluiert. **B:** Eluierte Fraktionen mit erhöhter  $A_{280}$  wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Eine Zuordnung der analysierten Fraktionen ist durch die gestrichelte Verbindungslinie angedeutet. **S**, Molekulargewichtsstandard.

Die entsprechenden Fraktionen wurden erneut vereint, konzentriert und mittels Gelpermeationschromatographie (Superdex 200 *prep grade* 16/60; 20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl) bis zur Homogenität gereinigt. Reine Fraktionen (Abb. 3.3) wurden vereint, auf 10 mg/mL Protein konzentriert und bei 4°C gelagert. Nach diesem Reinigungsprotokoll konnten bis zu 75 mg  $\alpha$ -Enolase aus einem Liter *E.coli*-Flüssigkultur gewonnen und für die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden.



**Abb. 3.3: SDS-PAGE Analyse der GPC-Fractionen**

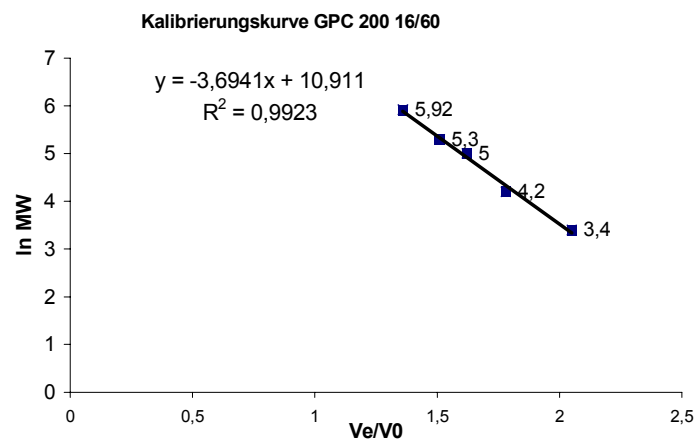
SDS-PAGE der eluierten Fraktionen nach der Gelpermeationschromatographie (GPC). Die vereinigten Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie wurden auf ein Volumen von 5 mL konzentriert und mittels Gelpermeationschromatographie (Superdex 75 *prep grade* 16/60; 20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl) gereinigt.

### 3.1.2 Bestimmung der Quartärstruktur der $\alpha$ -Enolase mittels analytischer Gelpermationsschromatographie (GPC)

Die gereinigte, konzentrierte Proteinlösung (10 mg/mL) wurde auf eine zuvor kalibrierte GPC-Säule (Superdex 200 *prep grade* 16/60; Puffer: 20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl) geladen und analysiert.

**Tabelle 3.1:** ermittelte Daten zur Bestimmung der Kalibriergeraden

Protein	Molekulargewicht MW (kDa)	Elutionsvolumen $V_e$ (mL)	ln MW	$V_e/V_0$
Carbonatanhydrase	29	90.4	3.4	2.05
Albumin	66	78.4	4.2	1.78
Alkoholdehydrogenase	150	71.2	5.0	1.62
$\beta$ -Amylase	200	66.4	5.3	1.51
Dextranblau	1000000	$44 = V_0$		
$\alpha$ -Enolase	360	60	5.92	1.36



**Abb. 3.4:** Grafische Darstellung der ermittelten Kalibrierungskurve

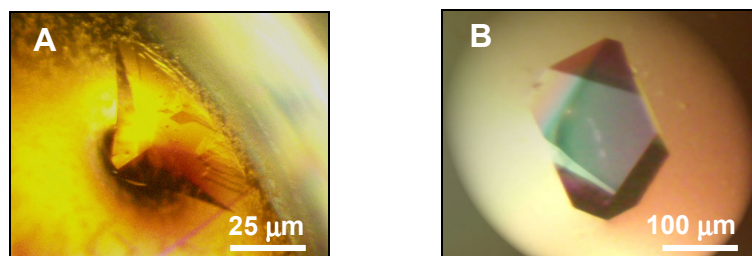
$V_e$ , Elutionsvolumen;  $V_0$ , Ausschlussvolumen der Säule; ln MW, dekadischer Logarithmus des Molekulargewichtes der zur Kalibrierung eingesetzter Proteine.

Die  $\alpha$ -Enolase wurde mit einem Volumen von 60 mL ( $V_e/V_0 = 1.36$ ) eluiert. Anhand der ermittelten Gleichung für die Kalibrierungskurve wurde ein Molekulargewicht von ca. 360 kDa ermittelt. Das berechnete Molekulargewicht von 47 kDa für eine  $\alpha$ -Enolasemonomer ergibt sich aus der bekannten Aminosäuresequenz. Das ermittelte native Molekulargewicht von ca. 360 kDa wies darauf hin, dass es sich bei der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* um eine oktamere Form handeln könnte.

### 3.1.3 Kristallisation der $\alpha$ -Enolase

Die Kristallisationseigenschaften der  $\alpha$ -Enolase (9 mg/mL) wurden unter verschiedenen Bedingungen getestet. Die initialen Kristallisationsexperimente erfolgten bei einer Temperatur von 20°C unter Verwendung verschiedener Kristallisations-Screens. Nach 14 Tagen wurde unter einer Bedingung des Wizard Screen II/44 ein kleiner, leicht schichtartig verwachsener Kristall erhalten (Abb. 3.5 A).

Zur Verbesserung der Kristallqualität wurden verschiedene Kristallisationsparameter wie pH, Fällungsmittel- und Proteinkonzentration variiert. Bei einer Fällungsmittelkonzentration von 18 % PEG 1000, einem pH-Wert von 7.5 und 20°C konnten deutlich größere und sauberer gewachsene Kristalle als unter der Originalbedingung erzeugt werden (Abb. 3.5 B). Nach ca. 14-tägigem Wachstum betrugen die maximalen Kantenlängen der  $\alpha$ -Enolase-Kristalle 315 x 180 x 100  $\mu$ m (Abb. 3.5 B). Diese Kristalle wurden für Röntgenbeugungsexperimente verwendet.



**Abb. 3.5: Kristalle der  $\alpha$ -Enolase**

Die Kristallisation der  $\alpha$ -Enolase (10 mg/mL) erfolgte nach der Methode des sitzenden (A) als auch des hängenden Tropfens (B) bei 20°C. **A:** Kristall aus Wizard Screen II/44 (20 % PEG 1000, 0.1 M Cacodylate pH 6.5, 0.2 M  $\text{MgCl}_2$ ). **B:** Röntgentauglicher Kristall bei 20°C mit 18 % PEG 1000, 0.1M Hepes pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ .

### 3.1.4 Datensammlung und -prozessierung

Der erste Röntgendatensatz (Datensatz I) der  $\alpha$ -Enolase wurde an der GBF (Hausanlage) unter Verwendung von  $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung mit einer maximalen Auflösung von 2.8 Å aufgenommen. Die zweite Messung (Datensatz II) wurde unter Verwendung von Synchrotron-Strahlung (Messstation BW6, DESY, Hamburg) mit einer Wellenlänge von 1.05 Å auf einem MAR CCD-Detektor mit einer maximalen Auflösung von 2.0 Å aufgezeichnet. Vor beiden Messungen wurden die  $\alpha$ -Enolase-Kristalle in verdampfendem Flüssigstickstoff tiefgekühlt (100 K), nachdem sie zuvor durch Tränkung in Kryoschutzmittel (10 % PEG 400 in Reservoirlösung) vor der Eiskristallbildung während der Tiefkühlung geschützt wurden.

Die Datenprozessierung, einschließlich der Raumgruppenbestimmung, wurde mit dem *HKL* Programmpaket (Otwinowski & Minor, 1997) durchgeführt. Die Indizierung des  $\alpha$ -Enolase Beugungsbildes zeigte eine innenzentrierte, tetragonale Kristallpackung. Die einfachste Raumgruppe, die diese Symmetrie erfüllt, ist  $I4$  ( $a=b\neq c$ ;  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ ). Die Prozessierung wurde mit dem Programm *DENZO*, die Skalierung mit *SCALEPACK* (unter 2.13.2 beschrieben) durchgeführt. Eine

höhere Raumgruppensymmetrie als I4 (z.B. I422) konnte durch die Skalierung ausgeschlossen werden. Die Daten der Auswertung sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2: Datensatz der  $\alpha$ -Enolase-Kristalle**

	Datensatz I (Cu K $\alpha$ )	Datensatz II (DESY)
<b>Raumgruppe</b>	I4	I4
<b>Gitterkonstanten (<math>a, b, c</math> [Å])</b>	$a = b = 144.6, c = 100.9$	$a = b = 143.7, c = 100.6$
<b>Anzahl gemessener Reflexe</b>	105227	225228
<b>Anzahl einmaliger Reflexe</b>	25624	68907
<b>Auflösung [Å]<sup>1</sup></b>	20 - 2.8	20 - 2.0
<b>Vollständigkeit [%]</b>	99.8 (99.8)	100 (100)
<b>Redundanz</b>	4.1 (3.9)	3.3 (3.1)
<b><math>R_{\text{sym}}</math> [%]<sup>2</sup></b>	12.0 (40.8)	8.2 (40.5)
<b><math>I/\sigma_I</math></b>	11.5 (3.5)	14.5 (2.6)

<sup>1</sup> Die Werte in Klammern beziehen sich immer auf die Schale der höchsten Auflösung.

$$^2 R_{\text{sym}} = \sum_{\vec{h}, i} |I(\vec{h}) - \langle I(\vec{h}) \rangle| / \sum_{\vec{h}, i} I(\vec{h})_i$$

Zur Abschätzung der Anzahl der Moleküle pro asymmetrische Einheit wurde das Volumen der Elementarzelle mit 2.076.982 Å<sup>3</sup> berechnet. Der Quotient aus Zellvolumen und Masse des Proteinmoleküls in Dalton liefert den Matthews-Parameter  $V_M$  (Matthews, 1968). Er liegt für Proteinkristalle normalerweise zwischen 1.7 und 3.5 Å<sup>3</sup>/Da, was einem Solvensgehalt von 30-70 % entspricht. Die tetragonale Raumgruppe I4 enthält acht symmetrische Einheiten pro Elementarzelle. Unter der Annahme von zwei  $\alpha$ -Enolasemonomeren pro asymmetrische Einheit ergibt sich ein Matthews-Parameter von  $V_M = 2.76$  Å<sup>3</sup>/Da (Solvensgehalt: 55 %), der demnach im erwarteten Bereich liegt. Es war demnach von 16  $\alpha$ -Enolasemonomere pro Elementarzelle auszugehen. Da die Gelfiltration Hinweise auf  $\alpha$ -Enolaseoktamere gegeben hat, kann von zwei Oktameren pro Elementarzelle ausgegangen werden.

Aus den gemessenen Beugungsintensitäten wurde mit dem Programm *GLRF* (Tong & Rossmann, 1997) eine Selbstrotationsfunktion berechnet. Sie ermöglicht es, Rotationssymmetrien im Kristall zu identifizieren. Insbesondere nicht-kristallographische Rotationssymmetrien (NCS), die über die kristallographischen Symmetrieelemente hinausgehen, sind hier von Interesse. Abbildung 3.6 zeigt die  $\kappa = 180^\circ$ -Ebene der Rotationsfunktion. Diese Ausrichtung der Selbstrotationsfunktion ist so gewählt, dass die vierzählige Rotationsachse ( $c$ -Achse) senkrecht zur Bildebene ausgerichtet ist und mittig in der Projektion als  $c^*$ -markiertes Maximum zu erkennen ist. Die  $a$ - und  $b$ -Achsen liegen waagrecht bzw. senkrecht in der Bildebene.

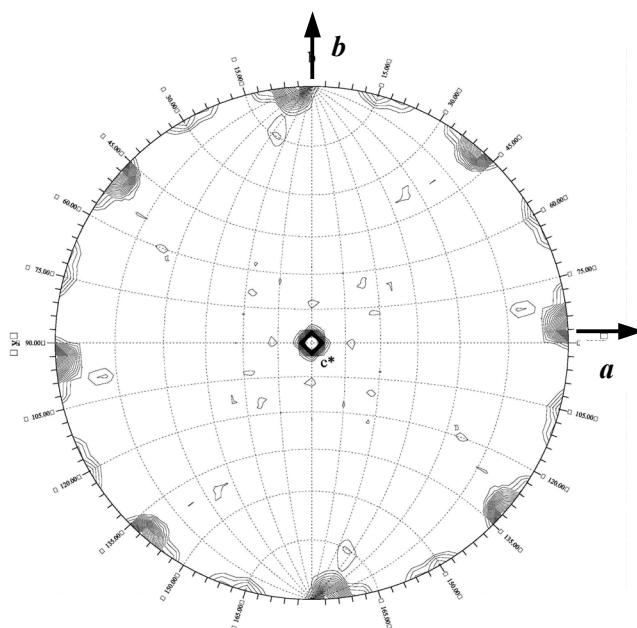


Abb. 3.6: Selbstrotationsfunktion ( $\kappa = 180^\circ$ ) des tetragonalen  $\alpha$ -Enolase-Kristalldatensatzes

Die  $\kappa = 180^\circ$  Sektion der Selbstrotationsfunktion gibt Aufschluss über alle zweizähligen Rotationsymmetrien (inklusive möglicher zweizähliger Schraubenachsen) der Kristallpackung. Das höchste Maximum ist, wie beschrieben, der kristallographischen vierzähligen Rotationsachse zuzuordnen. Die zusätzlichen Maxima, die sich in  $45^\circ$ -Schritten um den Äquator gruppieren, beschreiben insgesamt vier zusätzliche zweizählige Achsen, die senkrecht zur  $c$ -Achse stehen. Da die Achsen nicht entlang  $a$  und  $b$  ausgerichtet sind, handelt es sich hier nicht um kristallographische Achsen. Wäre dies der Fall, ergäbe sich die höhere Raumgruppensymmetrie  $I422$  und es läge ein Widerspruch zu den Ergebnissen der Skalierung vor. Die Verkippung der zweizähligen Achsen um  $5^\circ$  gegenüber der  $a$ -,  $b$ -Achse bzw. deren Winkelhalbierenden löst dieses Dilemma. Die Raumgruppe ist daher  $I4$ , die pseudo- oder nichtkristallographische Raumgruppensymmetrie  $I422$ .

### 3.1.5 Strukturlösung durch Molekularen Ersatz (MR)

Die Strukturlösung erfolgte mit der Methode des Molekularen Ersatzes (MR). Ein Sequenzvergleich zwischen der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* und der aus *E. coli* zeigt eine Sequenzidentität der beiden Proteine von 58 %. Folglich sollten beide strukturell sehr ähnlich sein. Die Struktur des  $\alpha$ -Enolasedimers (PDB-code: 1e9i) wurde als Suchmodell verwendet und die Suche mit dem Programm *EPMR* (*Evolutionary Programming for Molecular Replacement*; Kissinger *et al.*, 1999) durchgeführt. Entgegen herkömmlichen Methoden, nach denen zunächst die höchsten Maxima der Kreuzrotationsfunktion zwischen Modell und Beugungsdaten und nachfolgend die der Translationsfunktion ermittelt werden, optimiert *EPMR* die Lage und Orientierung einer zufallsgenerierten Anfangspositionierung des Modells in der Elementarzelle. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, bis eine optimale Lösung gefunden wird. Die Qualität einzelner Lösungen

wird durch Korrelationskoeffizienten gewertet. Im Falle der  $\alpha$ -Enolase wurde für die beste Lösung ein Korrelationskoeffizient von 56 % und ein R-Faktor von 47.2 % berechnet.

### 3.1.6 Verfeinerung

Die Verfeinerung der  $\alpha$ -Enolase-Struktur wurde zunächst durch Anwendung von Verfeinerungsprotokollen (*simulated annealing* und Torsionswinkelanpassung) des Programms *CNS* (Brünger *et al.*, 1998) durchgeführt. Für das anfängliche Modell, unter Verwendung von Daten bis zu einer maximalen Auflösung von 2.8 Å (Datensatz I), konnte der R-Faktor auf 24.7 % und der freie R-Faktor auf 30.0 % reduziert werden. Hierzu wurde das Programm *REFMAC* (NCS-Restraints & TLS-Verfeinerung, Murshudov *et al.*, 1997) in Kombination mit *ARP/WARP* (Lamzin & Wilson, 1993) zur Lokalisation von Wassermolekülen eingesetzt. Die Verfeinerung der Modellstruktur wurde durch abwechselnde Zyklen manueller Anpassung an die Elektronendichteverteilung mit dem Programm *O* (Jones *et al.*, 1991) und geometrischer Verfeinerung optimiert. Mehrere Zyklen manuellen Modellbaus, *TLS*-Verfeinerungen und die Lokalisierungen von Wassermolekülen reduzierten den R-Faktor auf 14.9 % (freier R-Faktor: 19.9 %) für alle Daten mit einer Auflösung zwischen 20 und 2.0 Å. Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

**Tabelle 3.3: Verfeinerungsstatistik**

	<b>Datensatz II</b>
<b>Auflösungsbereich [Å]</b>	20.0 – 2.0 (2.06-2.03)
<b>Anzahl der verwendeten Reflexe</b>	62576 (4621)
<b>Mittlerer Temperaturfaktor (B-Faktor) [Å<sup>2</sup>]</b>	25.2
<b>R-Faktor (%); R<sub>free</sub> (%)</b>	14.9 (17.0); 19.9 (22.7)
<b>Reste im Ramachandran-Kernbereich: bevorzugte; verbotene Bereiche (%)</b>	99.2; 0.8
<b>Standardabweichungen d. Bindungslängen [Å] und –winkel [°]</b>	0.025; 2.5

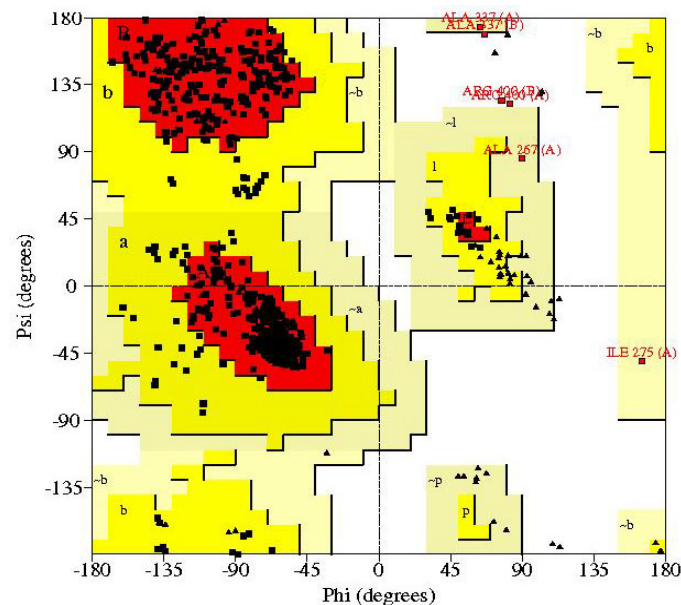
Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die Schale der höchsten Auflösung.

### 3.1.7 Struktur der $\alpha$ -Enolase

Das verfeinerte Strukturmodell der  $\alpha$ -Enolase besteht aus 421 Aminosäuren (Reste 1-40, 46 249, 255-432) pro Monomer bzw. aus zwei kristallographisch unabhängigen Monomeren pro asymmetrische Einheit, sowie 802 Wassermolekülen/Dimer. Pro Oktamer ergeben sich damit 3368 AS. Für die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren (klonierungsbedingt: MRGSHHHHHH = His<sub>6</sub>-Anker) und letzten beiden Aminosäuren (K431, K432) war nur bedingt eine Elektronendichte zu erkennen, was darauf hindeutet, dass diese Bereiche flexibel sind. Die Reste 41-45 und 250-255 sind in oberflächenexponierten Schlaufen lokalisiert und weisen eine gering definierte Elektronendichte auf. Eine eindeutige Positionierung dieser Aminosäuren ist daher nicht möglich. Die Reste 41-45, 250-255 und 433-434 wurden daher nicht in das Strukturmodell aufgenommen. Die



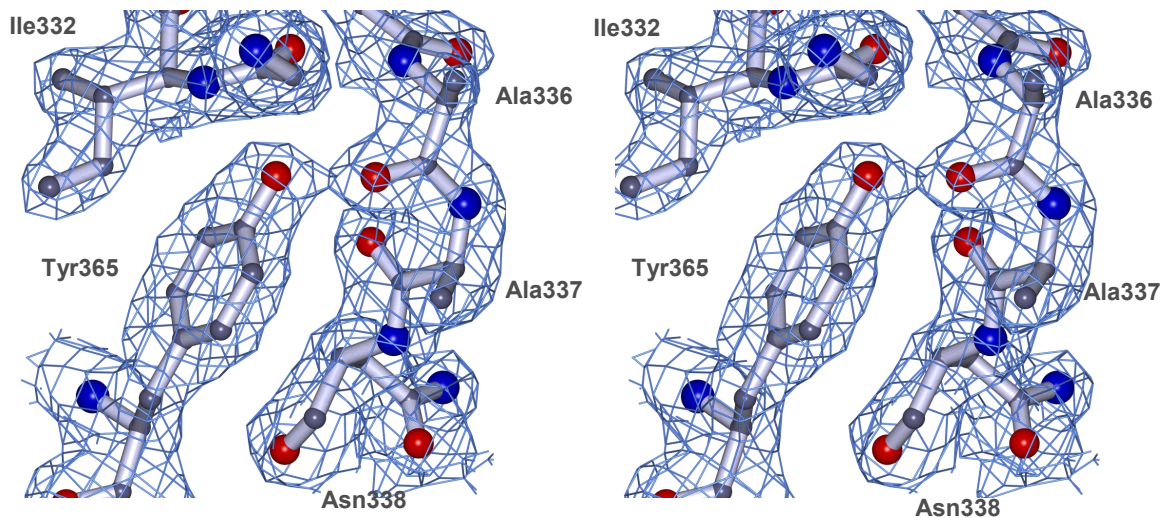
Analyse der durch die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  charakterisierten Proteinerückgrat-Konformation mit dem Programm *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993) ergibt, dass 89.5 % aller Aminosäuren sterisch bevorzugte Konformationen einnehmen (Abb. 3.7) und insgesamt 99.2 % sterisch günstige. Nicht berücksichtigt sind bei der Berechnung dieser Werte jeweils die Bereiche mit unzureichender Elektronendichte der Reste 41-45, 250-255 und 433-434.



**Abb. 3.7: Ramachandran-Plot der verfeinerten  $\alpha$ -Enolase Struktur**

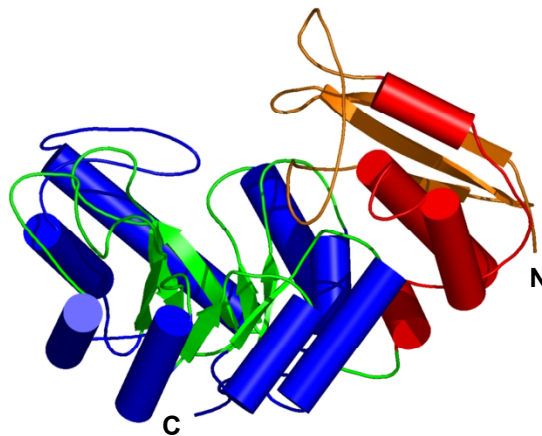
Die am günstigsten Hauptkettendiederwinkel-Konformationen sind rot eingefärbt. Etwas seltenere, aber durchaus erlaubte Konformationen sind gelb eingefärbt. Die blassgelben Bereiche gehören zwar zu den erlaubten, aber energetisch ungünstigen Winkelkonformationen. In den weißen Bereichen ist die Besetzung nicht erlaubt. Glycine werden durch ein schwarzes Dreieck symbolisiert, alle anderen Reste durch ein Quadrat. Aminosäuren, deren Konformationen verboten sind, sind namentlich gekennzeichnet.

Die Torsionswinkel der Hauptkette von Ala267, Ile275, Ala337 und Arg400 liegen außerhalb der erlaubten Ramachandran-Kernbereiche. Die unzureichende Qualität der Elektronendichte erlaubt für Ala267 und Ile275 keine genauere Positionierung, wodurch die Abweichung von Idealwerten zu erklären ist. Die Aminosäuren Ala337 und Arg400 sind in der Elektronendichte gut definiert. Die Abweichung von den Idealwerten muss daher strukturelle oder funktionelle Gründe haben. Arg400 ist an Monomer/Monomer-Kontakten beteiligt. Über das N<sup>n2</sup> bildet es eine Wasserstoffbrücke zum Hydroxysauerstoff der Ser15-Seitenkette des benachbarten Moleküls aus. Ähnliche Abweichungen des konservierten Arginins sind für die  $\alpha$ -Enolasen aus *E.coli* und Hefe beschrieben (Kühnel & Luisi, 2001; Lebiada *et al.*, 1989). Ala337 liegt in einer engen Schleife ohne ausgeprägte Sekundärstruktur, welche die  $\alpha$ -Helix 9 und den  $\beta$ -Faltblattstrang S9 miteinander verbindet und sich um die Seitenkette des Tyr365 legt. Wegen engen Kontakten zu dieser Seitengruppe liegt der *Psi*-Wert in diesem Fall in einem ungewöhnlichen Bereich (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Stereobild eines repräsentativen Ausschnittes der 2F0-FC-Karte, sowie des Proteinmodells im Bereich der Aminosäure Ala337. Die Aminosäuren sind in grau und die Elektronendichte ist in blau dargestellt.

Die dreidimensionale Struktur der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* ist anderen gelösten  $\alpha$ -Enolase-Kristallstrukturen erwartungsgemäß sehr ähnlich. Das  $\alpha$ -Enolase-Monomer besitzt eine nierenförmige Gestalt und besteht aus zwei Domänen. Die kleinere N-terminale Domäne (AS 1-143) formiert sich durch ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt mit engen Windungen gefolgt von vier  $\alpha$ -Helices. In der größeren C-terminalen Domäne (AS 144-434) bilden acht  $\beta$ -Stränge, die von acht  $\alpha$ -Helices umgeben sind, eine Fass-Struktur (TIM-Barrel; Abb. 3.9).

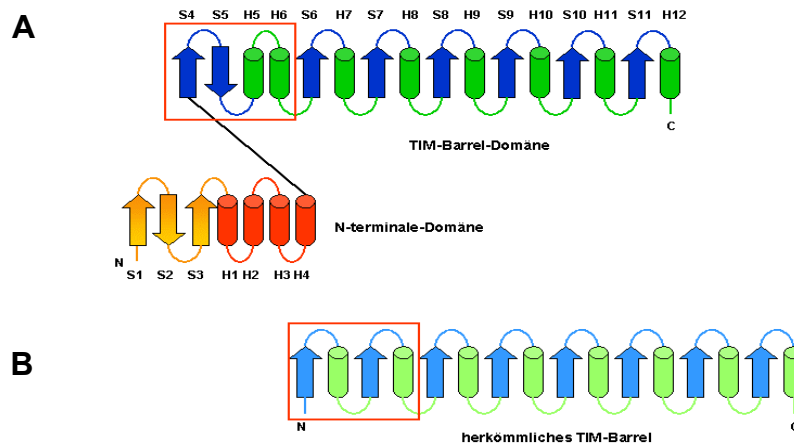


**Abb. 3.9: Das  $\alpha$ -Enolase Monomer**

Darstellung der monomeren  $\alpha$ -Enolase Struktur. Die N-terminale Domäne ist in rot/orange und die C-terminale Domäne in grün/blau dargestellt.  $\alpha$ -Helices sind als Zylinder und  $\beta$ -Stränge als Pfeile dargestellt.

Die Topologie der  $\alpha$ -Enolase-Barrel-Domäne weicht wie bei anderen  $\alpha$ -Enolasen von der idealen TIM-Barrel Struktur ab, welche durch sich abwechselnde parallele  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge die Fass-Struktur ausbildet. In diesem Fall spricht man von der  $(\beta\alpha)_8$ -Topologie. In den  $\alpha$ -Enolasen ist das innere  $\beta$ -Barrel nicht vollkommen parallel, der zweite Strang verläuft antiparallel zu den anderen Strängen und die Richtung der ersten  $\alpha$ -Helix ist ebenso umgedreht. Man spricht in die-

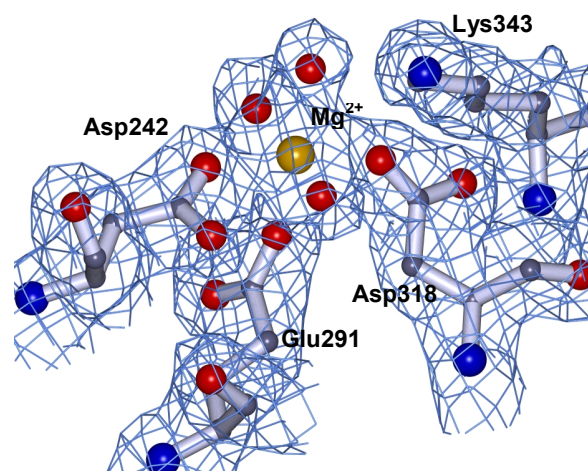
sem Fall von einer  $\beta\alpha\alpha(\beta\alpha)_6$ -Topologie, die in der vorliegenden Struktur ebenfalls zu finden ist (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: Topologie der  $\alpha$ -Enolase (A) und des Triosphosphat-Isomerase (TIM)-Barrel (B)**

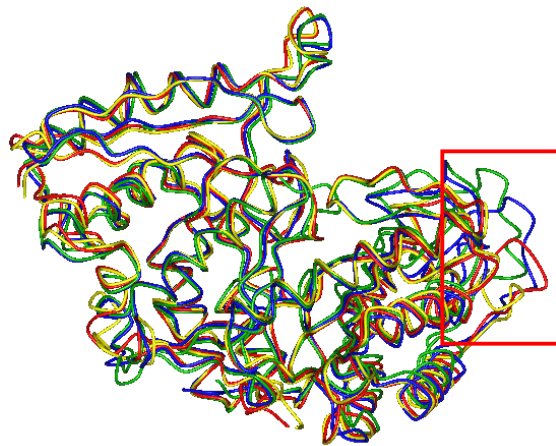
Vergleich der Sekundärstrukturabfolge der  $\alpha$ -Enolase Struktur (A) und des Barrels der Triosephosphat-Isomerase (B).  $\alpha$ -Helices sind als Röhren und  $\beta$ -Stränge als Pfeile dargestellt. Die Topologie der C-terminalen  $\alpha$ -Enolase Domäne weicht von der TIM-Barrel-Topologie ab (roter Rahmen).

Das aktive Zentrum der  $\alpha$ -Enolase ist, wie erwartet, am Ende der  $\beta$ -Stränge der C-terminalen Barrel-Domäne positioniert.  $\alpha$ -Enolasen katalysieren schrittweise die Dehydrierung von 2-Phosphoglycerat durch eine *anti*- $\beta$ -Eliminierung. Für die Reaktion werden zwei  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen benötigt, wobei das zweite  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion erst bindet, wenn das Substrat gebunden wurde und somit eine geringere Affinität besitzt als das erste  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion. In dieser  $\alpha$ -Enolase Struktur ist ein  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion im aktiven Zentrum über die konservierten Aminosäuren Asp242, Glu291 und Asp318 gebunden und oktaedrisch koordiniert (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11: Ausschnitt der  $2F_0-F_C$ -Karte sowie des Proteinmodells im Bereich der ersten  $\text{Mg}^{2+}$ -Bindungsstelle.** Die Aminosäuren Asp242, Glu291 und Asp318 sind in grau,  $\text{Mg}^{2+}$  ist in gelb und die Elektronendichte ist in blau dargestellt

Die Tertiärstrukturen der  $\alpha$ -Enolasen aus *S. pneumoniae*, *E.coli*, Hefe und Hummer sind nahezu identisch. Die Überlagerung der Proteine zeigt eine Standardabweichung der Positionen äquivalenter  $C_{\alpha}$ -Atome zwischen den Monomeren von 0.6 Å für *E.coli*, 1.02 Å für Hefe und 0.83 Å für Hummer. Standardabweichungen äquivalenter  $C_{\alpha}$ -Atome über 1.5 Å wurden in mehreren Schlaufen der Moleküle gefunden (Aminosäuren 54-58, 151-161, 211-217). Der größte strukturelle Unterschied zwischen prokaryontischen und eukaryontischen  $\alpha$ -Enolasen befindet sich in einer Schlaufe, die die Aminosäuren 243-270 umfasst, welche gleichzeitig die Region mit der höchsten Variabilität unter  $\alpha$ -Enolasen darstellt (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12: Überlagerte  $C_{\alpha}$ -Proteinrückgrate eines Monomers der  $\alpha$ -Enolasen**

Die  $C_{\alpha}$ -Rückgrate der  $\alpha$ -Enolasen aus Hefe (grün), Hummer (blau), *E.coli* (gelb) und *S. pneumoniae* (rot) wurden übereinandergelegt. Gekennzeichnet ist der Bereich höchster Abweichungen der  $\alpha$ -Enolasen untereinander (AS 243-270; roter Kasten).

Kristallstrukturen in Anwesenheit des Substrates PGA zeigen, dass diese Schlaufe zusammen mit zwei anderen Schlaufen (AS 38-45 und 152-159) für die Schließung des aktiven Zentrums nach Substratbindung verantwortlich ist und zu einer geschlossenen katalysekompetenten Enzymkonformation führt (Zhang *et al.*, 1997). Die  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* wurde in Abwesenheit des natürlichen Substrates PGA kristallisiert und repräsentiert daher die offene Enzymkonformation.

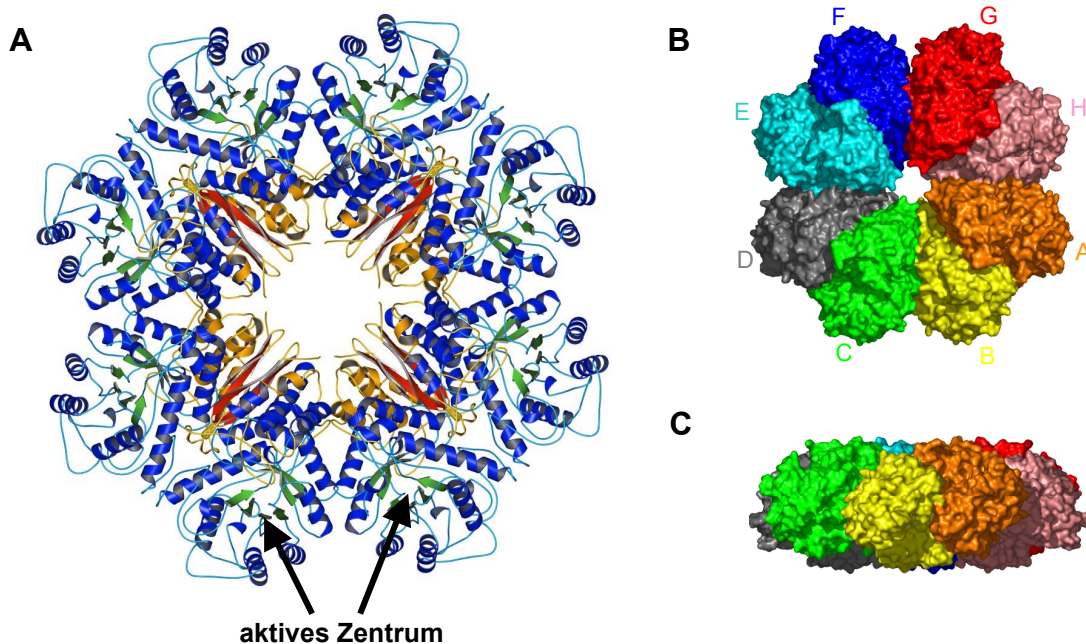
### 3.1.8 Das $\alpha$ -Enolase Oktamer

Während die  $\alpha$ -Enolasen aus *E.coli*, Hefe und Hummer eine dimere Quartärstruktur besitzen, verhält sich die  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* in Lösung unter physiologischen Bedingungen als Oktamer. Die Analyse der Selbstrotationsfunktion in Kombination mit der Raumgruppe und dem Matthews-Parameter können ebenfalls dahingehend interpretiert werden, dass die  $\alpha$ -Enolase eine oktamere Quartärstruktur besitzt, was durch die Kristallstruktur bestätigt wird.

Das Homooktamer der  $\alpha$ -Enolase setzt sich aus einem Tetramer von Dimeren zusammen und bildet eine scheibenartige Struktur in Form eines Ringes mit einer zentralen Pore (Abb. 3.13 A). Der Durchmesser des Oktamers, definiert durch den größten Abstand zwischen den äußersten



Atomen (Bsp. Monomer A und E), beträgt rund 153 Å, die Pore hat einen Durchmesser von etwa 19 Å.



**Abb. 3.13: Das  $\alpha$ -Enolase Oktamer**

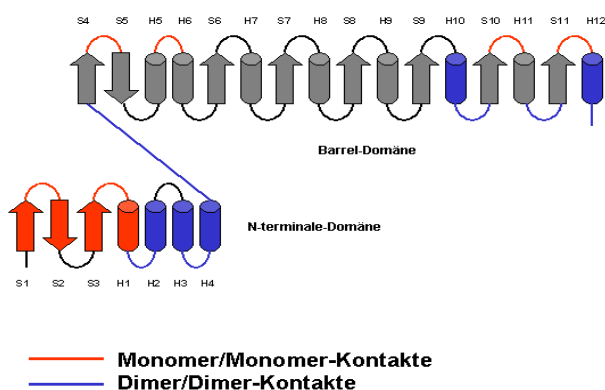
(A) Struktur der oktameren  $\alpha$ -Enolase. Die N-terminalen Domänen (rot/orange) liegen im inneren Ring, während die C-terminalen Domänen (blau/grün) den äußeren Ring bilden.  $\alpha$ -Helices sind als Spiralen und  $\beta$ -Stränge als Pfeile dargestellt. Die aktiven Zentren der acht Monomere sind im äußeren Ring des Oktamers positioniert (schwarze Pfeile). (B) Aufsicht der Oberflächenstruktur des Oktamers. Die Monomere A-H sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. (C) Seitenansicht von (B).

Eine Unterscheidung zwischen zufälligen (Packungsartefakte) und biologisch relevanten Kristallkontakten gestaltet sich schwierig, da eine Berechnung der freien Bindungsenthalpie aus der Struktur bisher nicht möglich ist. Um dennoch Aussagen über die relative Stärke von Wechselwirkungen in Kristallkontakten machen zu können, vergleicht man die *Buried Surface Area*. Sie stellt die Fläche dar, um die sich die solvenszugängliche Oberfläche der am Kontakt beteiligten Moleküle durch die Wechselwirkung verringert. Zufällig im Kristall entstehende Interaktionen besitzen zumeist Kontaktflächen, die unter 1000 Å<sup>2</sup> liegen (Jones & Thornton, 1996). Die Größe der Kontaktflächen von 3386 bzw. 2509 Å<sup>2</sup> ist somit ein wichtiges Indiz dafür, dass es sich bei der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* um ein physiologisches Oktamer handelt. Ein Packungsartefakt einer tetragonalen Packung kann somit ausgeschlossen werden. Wichtige Daten über die Monomer/Monomer-Kontaktfläche (AB-Kontaktfläche) bzw. Dimer/Dimer-Kontaktfläche (BC-Kontaktfläche) sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4 Eigenschaften der Kontaktflächen im Oktamer

Merkmal	AB-Kontaktfläche (zwischen zwei Monomeren)	BC-Kontaktfläche (zwischen zwei Dimeren)
Buried Surface Area (Å <sup>2</sup> )	3386	2509
polare Atome der Kontaktfläche (%)	53	46
unpolare Atome der Kontaktfläche (%)	47	55
Planarität	1.9 = flach	2.7 = verzahnt

Beobachtete Wechselwirkungen schließen sowohl Salzbrücken, als auch Wasserstoffbrücken und *van-der-Waals*-Kontakte ein. Bereiche bzw. Sekundärstrukturelemente der  $\alpha$ -Enolase, die an Monomer/Monomer- (rot) bzw. Dimer/Dimer-Kontakten (blau) beteiligt sind, sind in der Abbildung 3.14 dargestellt.

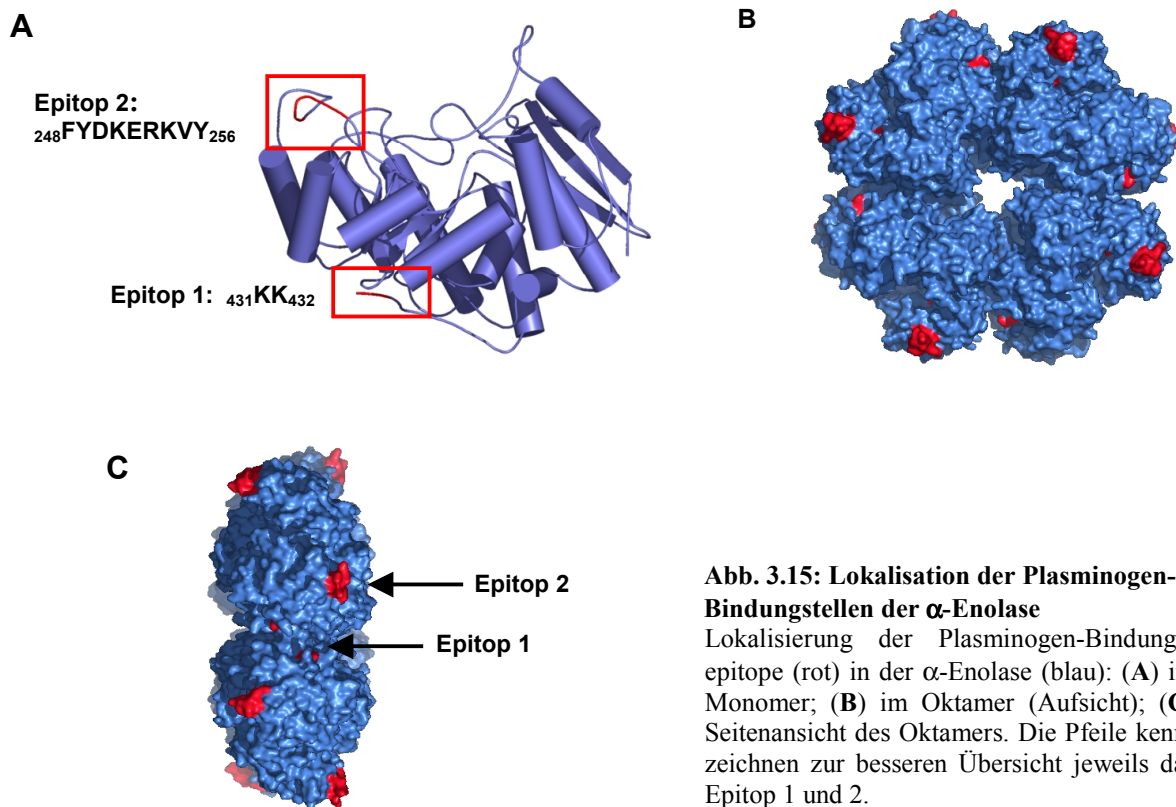
Abb. 3.14: Intermolekulare Kontakte der  $\alpha$ -Enolase

Darstellung der Topologie der Sekundärstrukturelemente und Kennzeichnung von Bereichen, deren Aminosäuren zur Ausbildung von intermolekularen Kontakten beitragen. Die Monomer/Monomer-Kontaktbereiche zur Ausbildung des Dimers sind in rot dargestellt, die Dimer/Dimer-Kontaktbereiche zur Ausbildung des Oktamers sind blau markiert.

### 3.1.9 Räumliche Lokalisation der Plasminogen-Bindungsstellen

Die Plasminogen-Bindungsstellen der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* konzentrieren sich auf zwei Bereiche, die C-terminalen Lysin-Reste (Reste 433-434; Epitop 1) und die Aminosäuren 248-256 (Epitop 2), pro Monomer (Bergmann *et al.*, 2003) und konnten mit Hilfe der Kristallstruktur räumlich zugeordnet werden (Abb. 3.15). Beide Bindungsepitope sind, wie zu erwarten, an der Oberfläche des Moleküls lokalisiert.

Die Aufsicht bzw. Seitenansicht des Oktamers zeigt, dass auf beiden Seiten des  $\alpha$ -Enolase-Oktamers (vorne und hinten) jeweils vier Bindungsstellen der Schleife (AS 248-256, Epitop 2) lokalisiert und gut zugänglich sind (Abb. 3.15 A-C). Die C-terminalen Lysin-Reste (Epitop 1) sind deutlich ungünstiger positioniert und liegen in einer Furche im Dimer/Dimer-Kontaktbereich (Abb. 3.15 C).



**Abb. 3.15: Lokalisation der Plasminogen-Bindungsstellen der  $\alpha$ -Enolase**

Lokalisierung der Plasminogen-Bindungs-epitope (rot) in der  $\alpha$ -Enolase (blau): (A) im Monomer; (B) im Oktamer (Aufsicht); (C) Seitenansicht des Oktamers. Die Pfeile kennzeichnen zur besseren Übersicht jeweils das Epitop 1 und 2.

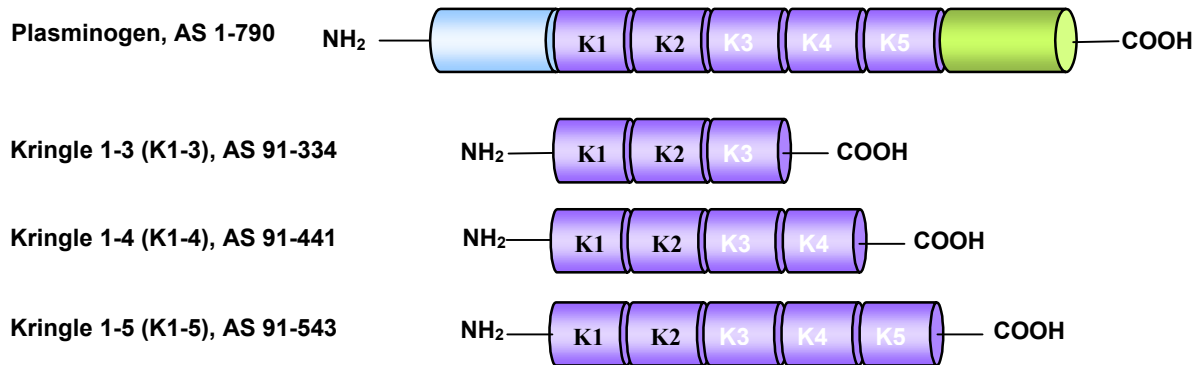
### 3.1.10 Interaktionsanalysen der $\alpha$ -Enolase mit verschiedenen Plasminogenteilfragmenten im Vergleich mit vollständigem Plasminogen

Die Interaktion zwischen Plasminogen und den natürlichen Liganden, wie z.B. Fibrinogen, erfolgt in der Regel über die Lysinbindungsstellen innerhalb der fünf Kringle-Domänen und den carboxyterminalen Lysinen des Liganden (Wistedt *et al.*, 1998). Inhibitionsversuche mit Lysinaloga zeigten, dass auch die carboxyterminalen Lysine der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* eine wichtige Funktion in der Plasminogenbindung ausüben. Darüber hinaus wird die Bindung über ein zweites Epitop vermittelt (Abb. 3.15). Um Hinweise zu erhalten, welche der möglichen fünf Kringle-Domänen mit der  $\alpha$ -Enolase wechselwirken, wurden im Rahmen dieser Arbeit Bindungsstudien mit verschiedenen Plasminogenteilfragmenten mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie und der analytischen Ultrazentrifugation durchgeführt.

#### a) Herstellung und Reinigung von Plasminogenteilfragmenten

Kringle-Domänen sind ca. 80 AS umfassende Tertiärstrukturen, die durch Disulfidbrücken nach einem bestimmten Muster (C1-6, C2-4, C3-5) ausgebildet werden (Bürgin & Schaller, 1998). Zahlreiche Veröffentlichungen zeigen, dass in *E.coli* produzierte Kringle-Domänen nur unter denaturierenden Bedingungen aus Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) isoliert werden können und eine aufwendige Rückfaltung der Domänen erfolgen muss. Eine vielversprechende Methode ist dagegen die sekretorische Proteinexpression mit dem *Pichia pastoris*-Expressionssystem, die

keine Rückfaltung erfordert. Dies konnte schon für Kringle 1-3 gezeigt werden (Shepard *et al.*, 2000). In Anlehnung an dieses Protokoll sollte daher die Proteinproduktion für K1-3, K1-4 und K1-5 in *P. pastoris* erfolgen (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Übersicht der Plasminogenteilfragmente zur heterologen Proteinproduktion in *Pichia pastoris*.**

Plasminogen: grün: N-terminale Domäne; hellblau: Kringle-Domänen 1-5; lila, katalytische Protease-Domäne (grün). Die herzustellenden Plasminogen-Module Kringle 1-3, 1-4 und 1-5 (lila) und Angaben über ihre Aminosäureanzahl sind unter dem Strukturschema des Plasminogens dargestellt. Alle Plasminogenteilfragmente enthalten die Mutation N289E zur Unterbindung von Glykosylierungen.

Zur Herstellung entsprechender Expressionsplasmide wurden die codierenden Sequenzen für die Plasminogenteilfragmente aus einem bestehenden Konstrukt mittels PCR amplifiziert (Daniela Wild, GBF). Die amplifizierte cDNA wurde zusammen mit einem Adapter-Oligonukleotid, das für einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Anker codiert, in den *P. pastoris* Expressionsvektor pPICZαA kloniert. Dieser Expressionsvektor enthält eine Signalsequenz zum Transport der Proteine aus *P. pastoris*. Alle Konstrukte enthalten die Mutation N289E zur Unterbindung von Glykosylierungen (Shepard *et al.*, 2000).

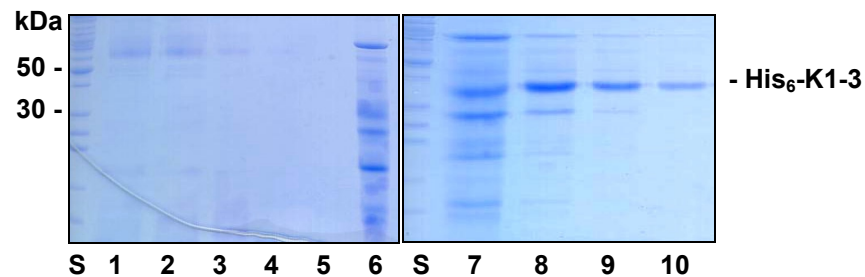
Es folgte eine stabile Integration durch homologe Rekombination der codierenden Sequenzen in das Genom des Expressionsstamms X-33. Positive Klone wurden unter Verwendung verschiedener Konzentrationen des Antibiotikums Zeozin auf mehrfach integrierte Kopien selektioniert. Die Proteinproduktion wurde im kleinen Maßstab überprüft. Für K1-3 N289E wurde ein Expressionsklon identifiziert, der im Vergleich zu anderen Klonen das Fusionsprotein in großen Mengen produzierte. Das K1-4-His<sub>6</sub>-Fusionsprotein bzw. das K1-5-His<sub>6</sub>-Fusionsprotein konnte weder mittels SDS-PAGE noch immunologisch im Kulturüberstand bzw. in den löslichen Proteinfraktionen der Hefe-Zellen nachgewiesen werden. Dieses Expressionssystem erweist sich somit für die Produktion löslicher K1-4 und K1-5-Proteine als ungeeignet.

### **b) Reinigung von K1-3 N289E**

Die höchste Produktionsrate des sekretierten His<sub>6</sub>-K1-3-Fusionsproteins erfolgte nach 48 h bei 28°C durch Induktion mit 0.5 % Methanol (Endkonzentration; Induktion alle 24 h im Schüttel-



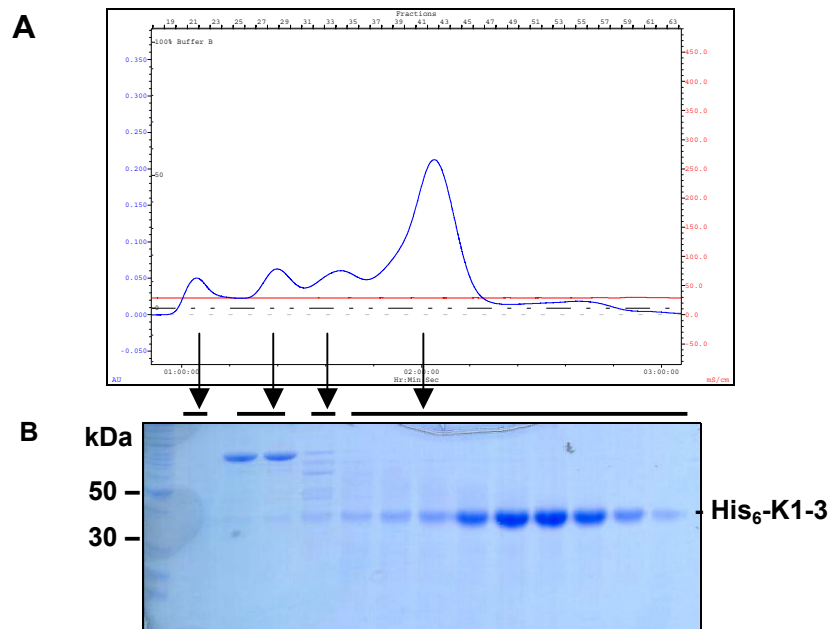
kolben). Eine Vorreinigung und Konzentrierung des Proteins wurde durch eine Affinitätschromatographie aus dem Kulturüberstand erreicht (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Affinitätschromatographie von K1-3N289E aus dem Kulturüberstand**

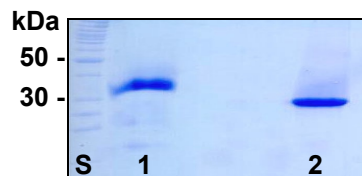
SDS-PAGE Analysen der Reinigung der K1-3 Mutante N289E mittels Ni-NTA (äquilibriert mit 20 mM Hepes pH 7.5) aus 2 L Kulturüberstand nach 48 h Proteinproduktion. S, Molekulargewichtsmarker; 1, nicht gebundene Proteine; 2-5 Waschfraktionen (Waschpuffer: 20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl); 6, an die Ni-NTA gebundene Proteine; 7-10, Eluatfraktionen mit K1-3N289E (Elutionspuffer: 20 mM Hepes pH 7.5, 0.5 M Imidazol).

Noch verbliebene Verunreinigungen wurden mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) entfernt (Abb. 3.18 A). GPC-Fractionen mit erhöhter  $A_{280}$  wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.18 B). Zusätzlich wurde durch diesen Schritt das native Molekulargewicht von K1-3 N289E bestimmt (Kalibrierung Kap. 3.1.2, Abb. 3.4). Aus dem Elutionsvolumen  $V_E = 88.5$  mL kann ein Molekulargewicht von 32 kDa abgeleitet werden, das mit dem theoretischen Molekulargewicht von 30 kDa gut übereinstimmt.



**Abb. 3.18: Reinigung von K1-3 N289E mittels GPC.** Nach der Elution von der Affinitätsmatrix wurden die entsprechenden Fraktionen vereint und zur Entfernung von Imidazol dialysiert (20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl). Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung konzentriert und mittels GPC bis zur Homogenität gereinigt. Peak-Fractionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. (A) Chromatogramm der GPC mit gemessener Absorption bei 280 nm (blau) und der Leitfähigkeit (mS/cm; rot). Säule: Superdex 200 p.g. 16/60; Laufpuffer: 20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl; Flussrate: 0.7 mL/min; Fraktionen 2 mL. (B) Analyse der Peakfraktionen mittels SDS-PAGE.

SDS-PAGE Analysen von Cystein-reichen Domänen unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen, liefern Hinweise darüber, ob eine korrekte Proteinfaltung oder durch unspezifische Disulfidbrückenverknüpfungen gebildete Aggregate vorliegen. Bis zur Homogenität gereinigte K1-3 N289E-Proteine zeigten unter reduzierenden Bedingungen ein höheres Molekulargewicht, da durch das Aufbrechen von Disulfidbrücken das Protein eine elongierte Form annimmt (Abb. 3.19, 1). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen besitzt das Protein das erwartete Molekulargewicht von 30 kDa (Abb. 3.19, 2). Unspezifische Aggregate liegen folglich nicht vor.



**Abb. 3.19: SDS-Page Analyse von K1-3 N289E unter reduzierenden (1) bzw. nicht reduzierenden Bedingungen (2). S, Molekulargewichtsmarker.**

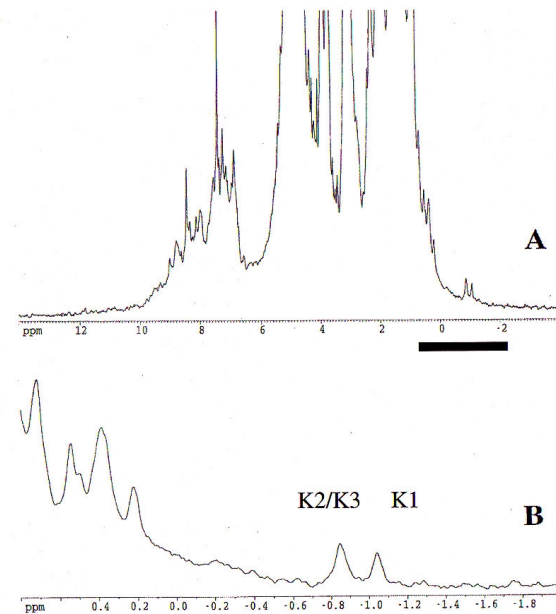
Homogene Proteinlösungen wurden vereint, auf 5-10 mg/mL Protein konzentriert und bei 4°C gelagert. Nach diesem Reinigungsprotokoll konnten 10 mg K1-3 N289E aus einem Liter Kulturüberstand gewonnen werden.

### c) Überprüfung der Proteinfaltung von K1-3 N289E mittels 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie

Auf der Basis von Kristallstrukturanalysen von Komplexen der Kringle-Domänen 1 und 4 mit verschiedenen Lysinanaloga wurden die für die Interaktion mit Liganden essentiellen Aminosäuren identifiziert (Mathews *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1991). Die Struktur der Lysin-Bindungsstellen setzt sich aus einem Dipol, mit anionischen und kationischen Regionen umrahmt von hydrophoben Bereichen aus aromatischen Aminosäuren, zusammen (Tulinski, 1991). Eindimensionale <sup>1</sup>H-NMR Spektren homologer Kringle-Domänen K1, K4 und K5 (Linás *et al.*, 1983; Thewes *et al.*, 1987) sind sich sehr ähnlich und zeigen alle eine ungewöhnliche chemische Verschiebung des  $\delta$ -Methyl-Signals des konservierten Restes Leu46. Die einheitliche Position bei  $\sim -1.0$  ppm wird durch anisotropische Ringflusseffekte der benachbarten aromatischen Reste Trp25 und Trp65 im hydrophoben Kern hervorgerufen, welche sich alle in räumlicher Nähe der Lysin-Bindungsstellen befinden (Söhndel *et al.*, 1996). Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren von K2 und 3 zeigen, im Gegensatz zu Kringle 1, 4 und 5, eine leichte Verschiebung dieses Signals zu  $-0.87$  ppm für K2 bzw.  $-0.94$  ppm für K3. Im Zusammenhang mit kristallographischen Daten deuten <sup>1</sup>H-NMR Spektren eine korrekte Faltung der jeweiligen Kringle-Domänen an.

Zur Überprüfung der Proteinfaltung wurde das rekombinante Plasminogenteilfragment K1-3 N289E mittels 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie untersucht (Kap. 2.12; Abb. 3.20). Die Auswertung des 1D-<sup>1</sup>H-NMR Spektrums zeigte, dass die charakteristischen  $\delta$ -Methyl-Signale des konservierten Restes Leu46 der drei Domänen (K1  $-1.05$  ppm, K2  $-0.87$  ppm und K3  $-0.94$  ppm) mit den

Werten aus der Literatur übereinstimmen, was auf korrekte Proteinfaltung hindeutet (Söhndel *et al.*, 1996).



**Abb. 3.20: 1D <sup>1</sup>H NMR Spektrum von K1-3 N289E**

600 MHz <sup>1</sup>H NMR Spektrum von intaktem Protein umfasst K1, 2 und 3 des humanen Plasminogens und zeigt die korrekte Faltung des Proteins. (A) vollständiges NMR Spektrum. (B) Ausschnitt aus A (siehe Balken), der die charakteristischen δ-Methyl Signale des konservierten Restes Leu46 in K1 mit -1.05, K2/K3 mit -0.85/-0.94 ppm zeigt.

#### **d) Analytische Ultrazentrifugation der α-Enolase und K1-3 N289E**

Die Interaktion zwischen α-Enolase und K1-3 wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Mit dieser Methode kann die direkte Wechselwirkung von Makromolekülen anhand ihrer jeweiligen Sedimentationseigenschaft in Lösung ermittelt werden. Dazu wurden beide Proteine gesondert und in verschiedenen molaren Verhältnissen analysiert (Kap. 2.11.2). Die Analysen der Einzelproteine zeigten, dass beide als einzelne Bande sedimentierten, ein Qualitätskriterium für eine homogene Proteinklösung. Der Sedimentationskoeffizient der α-Enolase beträgt 13.8 S, der von K1-3 2.8 S entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 350 kDa (Oktamer der α-Enolase) bzw. 30 kDa (K1-3). Die Analyse der Proteingemische in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen ergab in allen Ansätzen ausschließlich die beiden Sedimentationsbanden der Einzelproteine mit Sedimentationskoeffizienten von 13.8 bzw. 2.8 S (Tabelle 3.5). Eine Interaktion der Proteine bis zu einer Dissoziationskonstante  $K_D < 0.7$  mM kann ausgeschlossen werden.

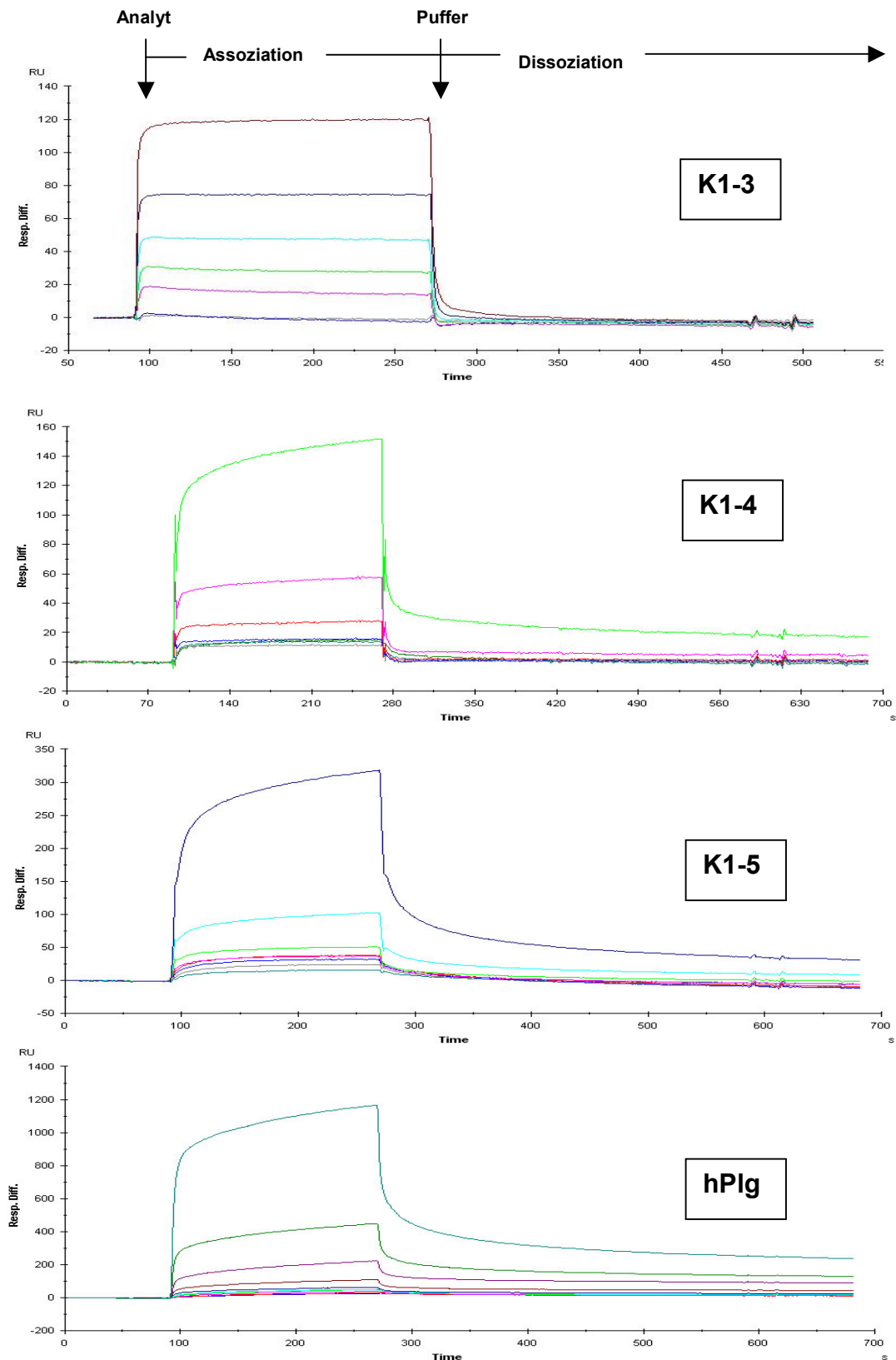
Tabelle 3.5: Daten der Interaktionsanalyse zwischen  $\alpha$ -Enolase und K1-3 N289E mittels AUZ

Nr.	$\alpha$ -Enolase [ $\mu$ M]	K1-3 N289E [ $\mu$ M]	molares Verhältnis Enolase:K1-3	20°C langsame Grenzschicht	20°C schnelle Grenzschicht
1	0	8.0	0:1	2.820	
2	14.0	0	1:0		13.770
3	3.12	6.26	1:2	2.770	13.720
4	3.88	5.82	1:1.5	2.670	13.710
5	5.11	5.11	1:1	2.660	13.610
6	6.49	4.32	1.5:1	2.740	13.710
7	7.49	3.75	2:1	2.750	13.770

### e) Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen eignet sich ebenfalls die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR), die im Gegensatz zur analytischen Ultrazentrifugation eine Analyse mit wesentlich geringeren Proteinmengen erlaubt. Da K1-4 und K1-5 im Rahmen dieser Arbeit nicht rekombinant hergestellt werden konnten, wurde auf kommerziell erhältliche Produkte (Calbiochem) zurückgegriffen. Plasminogen wurde freundlicherweise von Prof. Preissner (Universität Giessen) zur Verfügung gestellt. K1-4 und K1-5 standen nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung, was die Anzahl der Experimente stark limitierte und eine analytische Ultrazentrifugation aus diesem Grund nicht ermöglichte. Die Messungen mittels SPR sollten ausschließlich eine Abschätzung des Bindungsverhalten von K1-3, K1-4 und K1-5 relativ zum vollständigen Plasminogen ermöglichen.

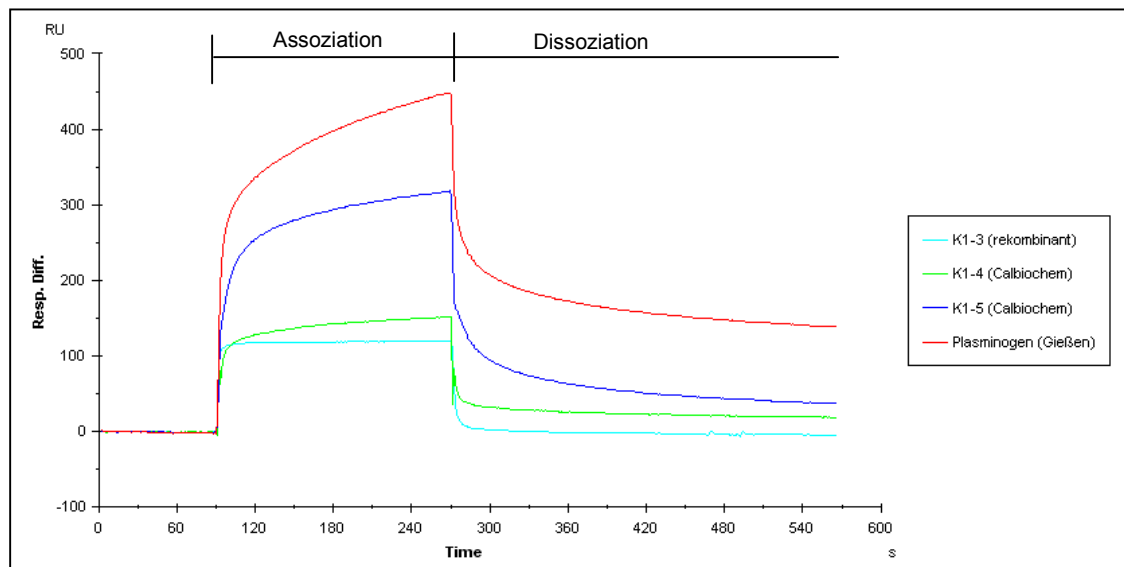
Die zur Homogenität gereinigte  $\alpha$ -Enolase wurde mit Hilfe von chemischen Quervernetzern kovalent auf der Oberfläche eines carboxymethylierten Sensor-Chips als Ligand gebunden. Die Analyten K1-3, K1-4, K1-5 und Plasminogen wurden für die Bindungsstudien in jeweils ansteigenden Konzentrationen von 0.016-5.0  $\mu$ M in HBS-Puffer eingesetzt. Die Messungen erfolgten in Echtzeit (Flussrate 10  $\mu$ L/min, 20°C) und die SPR-Signale (*resonance units*, RU) wurden durch Subtraktion der Referenzzelle von unspezifischen Signalen korrigiert. Die Sensorgramme der einzelnen Messreihen sind in Abbildung 3.21 dokumentiert.



**Abb. 3.21: Sensorgramme der Bindungsmeßreihen von  $\alpha$ -Enolase als immobilisierter Ligand mit rekombinantem K1-3, K1-4 (Calbiochem), K1-5 (Calbiochem) und Plasminogen als Analyten**

Dargestellt sind die Änderungen der Absorptionswinkel als Resonanzeinheiten (Resp. Diff.) in Abhängigkeit von der Zeit (s). Die Pfeile markieren den Start bzw. Stop der Injektion des jeweiligen Analyten. Assoziations- und Dissoziationsphasen sind stellvertretend für alle Messungen.

Die qualitative Auswertung, durch Vergleich der Bindungskurven bei gleicher Analytkonzentration, zeigt deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Analyten (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Vergleichender Bindungsverlauf der  $\alpha$ -Enolase mit vollständigem Plasminogen und verschiedenen Plasminogenteilfragmenten**

Vergleich der Oberflächenplasmonenresonanz-Netto-Sensorgramme (Referenzsignal wurde abgezogen) bei einer Analytkonzentration von 10  $\mu$ M. Dargestellt sind die Assoziations- und Dissoziationsphasen.

Der Vergleich der Bindungskurven zeigt, dass die Bindung von K1-3 (cyan) bzw. K1-4 (grün) an die immobilisierte  $\alpha$ -Enolase kinetisch sehr schnell verläuft. Nach Injektion stellte sich durch eine sehr schnelle Assoziation sofort ein Bindungsgleichgewicht (Plateau) ein. Die schlagartige Abnahme des Resonanzsignals nach Injektionsstop deutet eine schnelle Dissoziation an. Die Bindungen von K1-5 (blau) und Plasminogen (rot) verlaufen dagegen sehr viel langsamer. Nach einer, im Vergleich zu K1-3 bzw. K1-4 etwas verlangsamt Assoziationsphase, folgt eine wesentlich langsamere Dissoziationsphase. Plasminogen dissoziiert im Vergleich zu K1-5 noch langsamer (Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6: Ergebnisse der Bindungsanalyse der Plasminogenmodule bzw. Plasminogen**

Analyt	Bindungsverlauf	Fazit	Analytische Ultra-zentrifugation
K1-3 (rekombinant)	schnelle Assoziation und Dissoziation	schwache, instabile Bindung	keine Bindung
K1-4 (Calbiochem)	schnelle Assoziation und Dissoziation	schwache, instabile Bindung	Messung nicht möglich
K1-5 (Calbiochem)	schnelle Assoziation, langsamere Dissoziation als K1-3 bzw. K1-4	starke, stabile Bindung	Messung nicht möglich
Plasminogen	schnelle Assoziation, sehr langsame Dissoziation	starke, stabile Bindung	Messung nicht möglich

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass K1-5 scheinbar eine höhere Affinität für die  $\alpha$ -Enolase besitzt und im Gegensatz zu K1-3 bzw. K1-4 eine wesentlich stabilere Bindung

zeigt. Bergmann *et al.* (2003) untersuchten die Bindung von vollständigem Plasminogen an die  $\alpha$ -Enolase ebenfalls mit dieser Methode und zeigten, dass die Interaktion mit hoher Affinität über zwei unabhängige Bindungsereignisse verläuft ( $K_{D1}$  0.55 nM und  $K_{D2}$  86.2 nM). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bindung von K1-5 an die  $\alpha$ -Enolase scheinbar durch eine Interaktion von K5 mit einer der beiden Plasminogen-Bindungsstellen induziert wird, welche durch die Bindung einer zweiten Kringle-Domäne (K1, K2 oder K4) an die zweite Plasminogen-Bindungsstelle stabilisiert wird.

Im Gegensatz zur analytischen Ultrazentrifugation wurde mittels SPR eine Interaktion von K1-3 mit der  $\alpha$ -Enolase gezeigt. Eine unspezifische Bindung von K1-3 kann in diesem Fall ausgeschlossen werden. So zeigte die Injektion von TTL als Negativkontrolle kein Anstieg der Resonanzsignale, während hingegen die Injektion eines Antikörpers gegen die  $\alpha$ -Enolase als Positivkontrolle einen typischen SPR-Bindungsverlauf widerspiegelte. Es bleibt daher zu diskutieren, was den Unterschied der beiden Methoden ausmacht.

### 3.1.11 Kokristallisationsversuche der $\alpha$ -Enolase mit Plasminogen

Die SPR-Messungen mit den verschiedenen Plasminogenteilfragmenten ergab, dass mindestens zwei Kringle-Domänen an der  $\alpha$ -Enolase-Interaktion beteiligt sein müssen. Eine genaue Eingrenzung auf bestimmte Kringle-Domänen kann anhand der erhaltenen Bindungsstudien nur ansatzweise erfolgen und erfordert weitere Versuche, für die jedoch nicht ausreichend Material vorlag. Daher wurden erste Kokristallisationsexperimente mit dem vollständigen Plasminogen und der  $\alpha$ -Enolase durchgeführt.

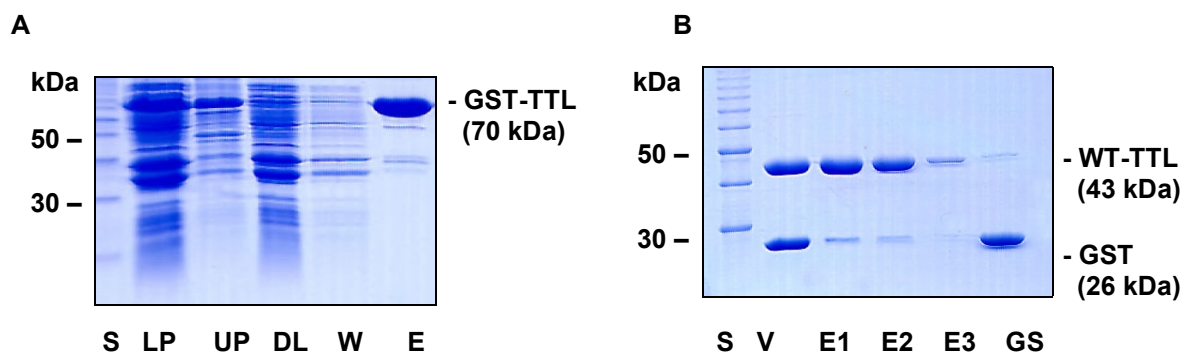
Im Vorfeld wurde versucht, den Komplex aus der  $\alpha$ -Enolase und Plasminogen mittels GPC zu isolieren, um unkomplexierte Proteinanteile zu vermeiden. Beide Proteine konnten jedoch nur getrennt isoliert werden. Demnach wurde für Kristallisationsexperimente nach der Methode des sitzenden Tropfens Plasminogen zunächst in einem 1.5-fachen Überschuss mit der  $\alpha$ -Enolase vermischt, um eine mögliche Kristallisation unkomplexierter  $\alpha$ -Enolase zu vermeiden. Das Proteingemisch wurde auf 9 mg/mL Protein konzentriert und für Kristallisationsversuche unter Verwendung verschiedener Kristallisations-Screens bei 20°C eingesetzt. Unter keiner der getesteten Bedingungen konnten Proteinkristalle beobachtet werden. Weitere Kristallisationsversuche konnten im Rahmen dieser Arbeit aus Mangel an Plasminogen nicht mehr durchgeführt werden.

## 3.2 Tubulin-Tyrosine Ligase: Untersuchungen zur Struktur und Funktion

### 3.2.1 Produktion, Reinigung und Untersuchungen zum proteolytischen Abbau der Wildtyp-TTL

Alle im Weiteren beschriebenen TTL-Proteine wurden nach einem modifizierten Standardreinigungsprotokoll hergestellt. Es wird daher das Reinigungsprotokoll für das rekombinante Fusionsprotein aus GST und TTL (Wildtyp) aufgeführt. Dieses ließ sich auf alle TTL-Mutanten übertragen.

Die heterologe Proteinproduktion des Fusionsproteins erfolgte in dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus™. Die höchste Ausbeute an löslichem Fusionsprotein wurde nach 20 h bei 20°C und Induktion unter Zusatz von 0.1 mM IPTG produziert (Abb. 3.23 A).



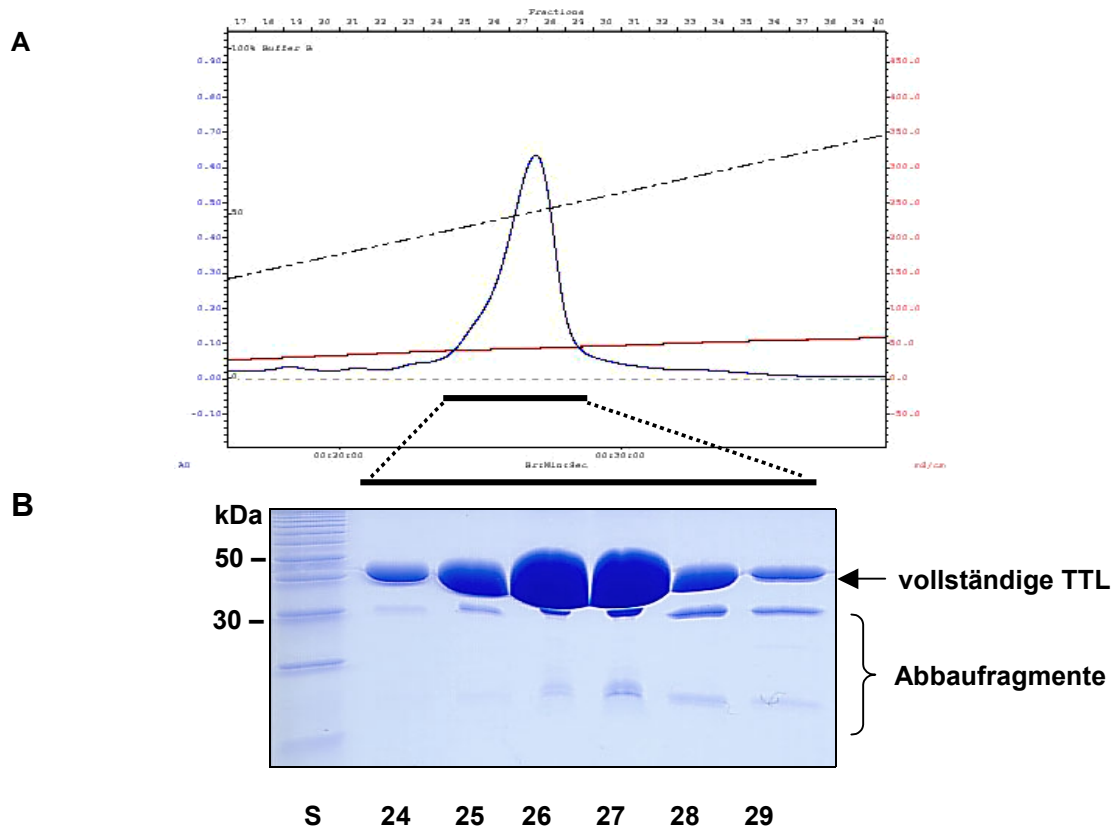
**Abb. 3.23: A) Reinigung der WT-TTL aus *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus™.**

A) Nach Trennung der löslichen (LP) und unlöslichen *E. coli* Gesamtzellproteine (UP) wurde das Fusionsprotein affinitätschromatographisch aus dem löslichen Zellextrakt isoliert (E), nachdem zuvor unspezifische Proteine isoliert worden sind (DL, W). S, Molekulargewichtsmarker. B) Abspaltung des GST-Fusionsanteils. Das isolierte GST-TTL-Fusionsprotein wurde proteolytisch verdaut (V). Anschließend erfolgte eine Elution der TTL (E1-3) von der Affinitätsmatrix, während GST an der Matrix zurückgehalten wurde (GS), S, Molekulargewichtsmarker.

Nach der affinitätschromatographischen Vorreinigung des Fusionsproteins erfolgte eine endoproteolytische Abspaltung der GST-Fusionseinheit mit Hilfe der PreScission Protease. Zur Entfernung des GST-Fusionsanteils und der Protease aus der Proteinlösung erfolgte eine zweite Affinitätschromatographie (Abb. 3.23B).

Verbliebene Verunreinigungen mit dem GST-Fusionsanteil wurden durch eine Kationenaustauschchromatographie von der TTL entfernt (Abb. 3.24).

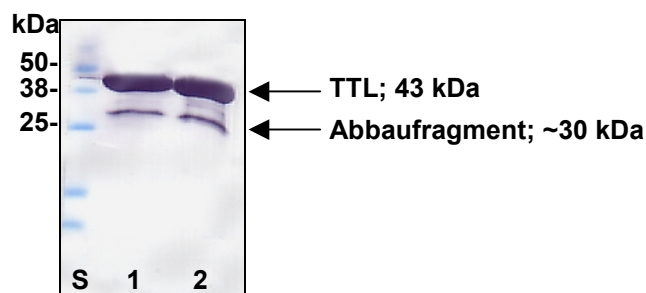




**Abb. 3.24: Reinigung der WT-TTL mittels Kationenaustauschchromatographie**

Nach proteolytischer Abspaltung der GST-Fusionseinheit wurde die TTL von der GS eluiert, dialysiert und mittels Kationenaustauschchromatographie von Verunreinigungen getrennt. Die Peak-Fractionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. **A:** Chromatogramm der Kationenaustauschchromatographie mit gemessener Absorption (AU280, blau) und der Leitfähigkeit (mS/cm, rot) während der Chromatographie. Säule: MonoS HR10/10; Laufpuffer: 20 mM Citratpuffer pH 6.0 ± 1M NaCl; Gradient 0-1 M NaCl; Flussrate: 1 mL/min; Fraktionsgröße: 1 mL. **B:** Analyse der Mono S-Fractionen mittels SDS-PAGE. S, Molekulargewichtsmarker, 24-29: Fraktionen aus A. Gekennzeichnet sind die Abbaufragmente der TTL, die bei der Präparation der TTL auftreten.

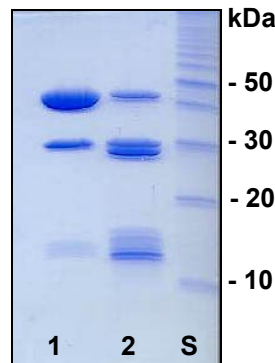
Nach diesem Präparations- und Reinigungsprotokoll wurden bis zu 18 mg TTL aus einem Liter *E. coli*-Flüssigkultur gewonnen. Bei einer anschließenden immunochemischen Analyse des konzentrierten Proteins mittels monoklonaler *anti*-TTL-Antikörper wurden die noch vorhandenen niedermolekularen Proteinbanden als TTL-Abbaufragmente identifiziert (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25: Immunochemische Analyse der TTL**

Western-Blot Analyse (anti-TTL-Antikörper: LA/C4) gereinigter WT-TTL. S, Molekulargewichtsmarker; 1, WT-TTL (10 µg); 2, WT-TTL (15 µg).

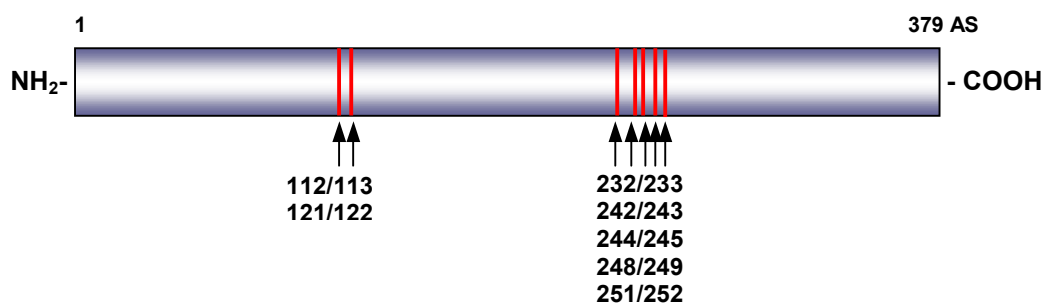
Die SDS-PAGE Analyse frisch präparierter TTL zeigte, dass diese nach längerer Lagerung bei 4°C in mehrere Fragmente abgebaut wurde. Die Abbaufragmente lagen jeweils im 30 kDa bzw. 14 kDa-Bereich (Abb.3.26). Weiterhin war zu beobachten, dass TTL-Lösungen mit zunehmenden Alter stark präzipitieren.



**Abb. 3.26: Proteolytischer Abbau der TTL in Abhängigkeit der Zeit**

Frisch präparierte TTL (1) wurde nach einer zweimonatigen Lagerung bei 4°C (2) erneut mittels SDS-PAGE untersucht. S, Molekulargewichtsstandard.

Die Anfangssequenzen aller Abbaufragmente wurden mittels N-terminaler Sequenzanalyse identifiziert und sind in folgender Abbildung zusammengefasst (Abb. 3.27).



**Abb. 3.27: Schematische Darstellung der mittels N-terminaler Sequenzanalyse identifizierten Spaltstellen der TTL. Pfeile und Zahlen geben die Aminosäuren an, zwischen denen eine Spaltung stattfindet.**

Die Analysen zeigten, dass neben der bekannten V8-Protease-Schnittstelle, die zwischen Glu248 und Tyr249 liegt (Wehland & Weber, 1987a), in diesem Bereich weitere Angriffspunkte für bislang nicht identifizierte Proteasen liegen. Der zweite Protease-empfindliche Bereich umfasst die Region der Aminosäuren 112/113 bzw. 121/122. Über diese Bereiche hinaus wurden keine weiteren Spaltstellen identifiziert. Allgemein gilt jedoch, dass die Fragmente auch im gespaltenen Zustand eine strukturelle Einheit bilden und nicht durch native Trennverfahren isoliert werden können (Daten nicht gezeigt).

Verschiedene Ansätze, die zur Stabilisierung des Proteins und zur Minimierung des Abbaus dienen sollten, konnten eine fortschreitende Degradierung des Proteins nicht verhindern (Daten nicht gezeigt). Eine Spaltung durch die PreScission-Protease, die der Abspaltung des Fusionsanteils dient, konnte ausgeschlossen werden, da die Spaltung auch bei einem TTL-Protein ohne abzuspaltendes Fusionsprotein erfolgte. Auch ein Ausweichen auf eukaryontische Expressionssysteme

(*Pichia pastoris*, Baculovirus-System in Insektenzellen) konnte den Abbau nicht verhindern. Eine Sequenzspezifität zur Identifizierung unbekannter Proteasen konnte nicht festgestellt werden, da selbst bei Deletionsmutanten (AS  $\Delta 112/113$ ,  $\Delta 245-247$ ,  $\Delta 247-249$ ) eine Degradierung zu beobachten war.

### 3.2.2 Kokristallisation von TTL-Mutanten mit ADP und Röntgenkristallographische Analysen

Die immunchemische Analyse mit monoklonalen anti-TTL-Antikörpern zeigte, dass gereinigte WT-TTL unter oxidierenden Bedingungen unspezifisch über Disulfidbrücken oligomerisiert, wodurch eine polydisperse Proteinlösung entsteht (Ehinger, 2000). Dadurch ist die Grundvoraussetzung für die Kristallisation, eine homogene Proteinlösung, nicht erfüllt. Hydrophobizitätsanalysen der Aminosäuresequenz ergaben, dass drei von sieben Cysteinen auf der Oberfläche des Moleküls lokalisiert sind. Dass die Aggregation durch Disulfidbrückenbildung der TTL ein entscheidendes Hindernis ist, wurde bewiesen, da nach gezieltem Austausch exponierter Cysteine (Cys72, Cys238, Cys244; Mutante TTL11) gegen Serin erstmals Kristalle der TTL erhalten wurden (Kristallisationsbedingung: 0.1 M Imidazol/HCl pH 8.0, 0.2 M Ca(OAc)<sub>2</sub>, 10 % PEG 8000). Die nadelförmigen Kristalle konnten röntgenkristallographisch bis zu einer maximalen Auflösung von 8.0 Å vermessen werden und besaßen eine rhomboedrische Kristallsymmetrie (vermutlich Raumgruppe R32) mit einer spezifischen Kristalldichte  $V_M = 2.3 \text{ Å}^3/\text{Da}$ . Aufgrund ihres geringen Streuvermögens eigneten sich die Kristalle nicht zur Röntgenstrukturanalyse. Eine umfangreiche Variation der Kristallisationsbedingung (pH-Wert, Fällungsmittelkonzentration, Temperatur) führte nicht zu einer Verbesserung der Kristalle. Weiterhin war auffällig, dass diese Mutante, trotz Austausch der drei exponierten Cysteine, Aggregate bildete.

Basierend auf der kristallisierbaren Mutante TTL11 wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Cystein-Mutanten generiert, um Kristalle mit einer höheren Auflösung für Röntgenstrukturanalysen zu erhalten. Der Austausch weiterer Cysteine erfolgte mittels ortsgerichteter Mutagenese gegen die konservative, polare Aminosäure Serin. Neu generierte Cystein-Mutanten (Tab.3.7) wurden ebenfalls als GST-Fusionsproteine exprimiert, nach Standardprotokoll (Kap. 3.2.1) bis zur Homogenität gereinigt und für Kristallisationsexperimente eingesetzt.

**Tabelle 3.7: Zur Kristallisation verwendete Cystein-Mutanten**

Mutante	Mutationen	Anzahl der ausgetauschten bzw. vorhandenen Cysteine
<b>TTL11</b>	C 72/238/244	3/4
<b>TTL12</b>	C 72/238/244/338 S	4/3
<b>TTL13</b>	C 72/91/238/244 S	4/3
<b>TTL14</b>	C 72/238/244/294 S	4/3
<b>TTL15</b>	C 72/238/244/347 S	4/3
<b>TTL16</b>	C 72/91/238/244/338 S	5/2
<b>TTL17</b>	C 72/238/244/338/347 S	5/2
<b>TTL18</b>	C 72/91/238/244/347 S	5/2
<b>TTL19</b>	C 72/91/238/244/294/347 S	6/1
<b>TTL20</b>	C 72/91/238/244/338/347 S	6/1
<b>TTL21</b>	C 72/91/238/244/294/338/347 S	7/0

Die Löslichkeit und damit Stabilität eines Proteins ist eine wichtige Voraussetzung für die Kristallbildung. Die Löslichkeit eines Proteins kann in sogenannten Grid-Screens unter verschiedenen Konzentrationen eines Fällungsmittels im Rahmen eines pH-Gradienten umfangreich untersucht werden. Die Kristallisationseigenschaften der gereinigten Cystein-Mutanten wurden unter Verwendung verschiedener Grid-Screens bei einem pH-Gradienten von 4.0 – 9.0 und verschiedenen Konzentrationen der Fällungsmittel Ammoniumsulfat, PEG6000/LiCl bzw. PEG6000 untersucht. Die Kristallisationstropfen wurden sofort nach dem Ansetzen, nach einem Tag und nach einer Woche auf Präzipitate analysiert.

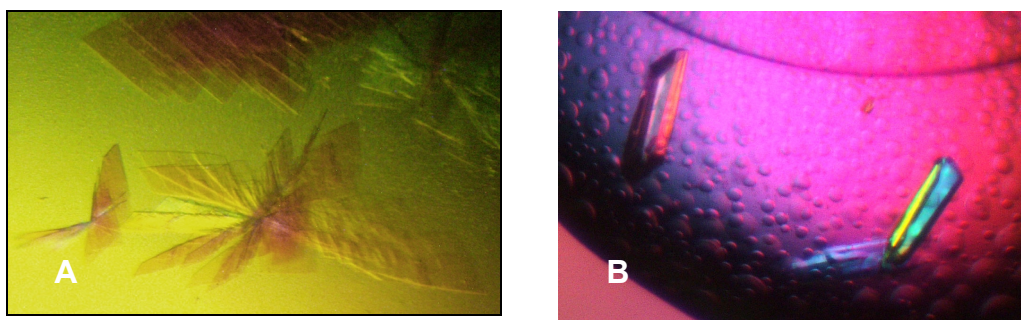
Die Auswertung der Screens zeigte, dass die TTL bei den pH-Werten 4.0 und 5.0 sofort präzipitierte. Auch eine Wiederholung mit geringeren Proteinkonzentrationen bei diesen pH-Werten führte zur sofortigen Präzipitatbildung. Die Fällungsmittel PEG6000 und PEG6000/LiCl führten, unabhängig vom pH-Wert, ebenfalls nach einem Tag bei hohen und nach einer Woche bei niedrigen Fällungsmittelkonzentrationen zur Präzipitatbildung. In Anwesenheit von Ammoniumsulfat unter 2.4 M verhielt sich die TTL bei pH-Werten 6-7 weitaus löslicher und präzipitierte erst nach einer Woche. Das Herabsetzen der Proteinkonzentration führte zwar deutlich zu einer verbesserten Löslichkeit der TTL, Proteinkristalle konnten jedoch nicht erzeugt werden. Das Ergebnis zeigt, dass die TTL ein geringes Löslichkeitsverhalten aufweist und ein relativ instabiles Protein ist. Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Lagerung (4°C) beobachtet. Vorangehende Versuche zeigten, dass die TTL bei einem pH-Wert von 6.0 zunächst für ca. 1 Woche gut löslich war (Ehinger, 2000). Über einen längeren Lagerungszeitraum präzipitiert das Protein jedoch auch in Lösung, unabhängig von funktionell wichtigen Kofaktoren. Dass die Präzipitatbildung nicht mehr mit dem Aggregationsverhalten zusammenhängen konnte, sondern einen anderen Grund haben musste, zeigte die Cystein-freie Mutante. Diese Mutante wies, vergleichbar mit anderen Cystein-Mutanten, ebenfalls ein geringes Löslichkeitsverhalten auf. Dies erforderte stets für alle Versuche eine frische Isolierung und Reinigung der TTL.

Weitere Kristallisationsexperimente erfolgten nach der Methode des „Sitzenden Tropfens“ (*sitting drop*) unter Verwendung verschiedener Kristallisations-Screens (Crystal Screen I + II, Wizard Screen I + II, JBC Screen I–X, Cryo Screen) bei 20°C bzw. 4°C. Kristalle der TTL11-Mutante bilden sich ausschließlich in Anwesenheit des Kofaktors APD (Ehinger, 2000). Aus diesem Grund wurde zu jeder Proteinlösung 3 mM ADP direkt vor der Kristallisation dazugegeben. Alle Kristallisationsexperimente wurden unter reduzierenden Bedingungen (10 mM DTT) durchgeführt.

Die Analyse der Kristallisationsansätze zeigte, dass das Protein in ca. 80 % aller getesteten Bedingungen sofort oder nach einem Tag präzipitierte. Bis dahin klare Tropfen wiesen nach 2-3 Tagen Präzipitate auf. Um die schnelle Präzipitation der TTL nach dem Vermischen mit dem Fällungsmittel zu vermeiden, wurde wiederum die Proteinkonzentration variiert. Dies führte jedoch erst zu einer verringerten Präzipitationsrate, wenn geringere Konzentrationen unter 5 mg/mL eingesetzt wurden, die ein Wachstum großer Kristalle unwahrscheinlich macht. Mikrokristalle wurden in keinem der Ansätze beobachtet. Die Wiederholung von klaren Ansätzen mit höheren Proteinkonzentrationen führte wiederum zur Präzipitatbildung, zur Bildung von Salzkristallen oder zu keiner Protein-Kristallbildung.

Mit den Cystein-Mutanten TTL19 und TTL21 konnten jedoch Kristalle mit einem neuen Habitus erhalten werden. Beide Mutanten kristallisierten unter der gleichen Bedingung (0.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 M MES pH 6.5, 30% PEG 5000 MME) und zeigten die gleiche Morphologie in Form von miteinander verwachsenen, sehr dünnen Plättchen (Abb.3.28 A). Die anderen Proteine TTL12-18 bzw. TTL20 zeigten unter keiner der getesteten Bedingungen Kristalle.

Die Kristalloptimierung dieser Bedingung gestaltete sich schwierig und wenig reproduzierbar. Einerseits konnten die Kristalle nur mit frisch präparierten Proteinlösungen reproduziert werden, da länger gelagerte TTL-Lösungen präzipitierten und somit zu einer inhomogenen Proteinlösung führten. Andererseits führte das Verhältnis von Polyethylenglykol und Ammoniumsulfat im Laufe der Zeit stets zu einer Phasentrennung, an der überwiegend das Kristallwachstum stattfand. Zur Kristalloptimierung wurden verschiedene Polyethylenglykole, Puffersysteme, pH-Werte und Additive (Additive Screen I, II + III, Hampton Research) getestet. Ein positiver Einfluss von Additiven (Kohlenhydrate, chemische Quervernetzer, Salze, Chelatoren etc.) auf das Kristallwachstum konnte nicht beobachtet werden. Die Verwendung von PEG 3350 bei einem pH-Wert von 6.0 hingegen verbesserte die Kristallqualität teilweise und führte zu deutlich größeren Kristallen (Abb 3.28 B), die röntgenkristallographisch untersucht werden konnten.

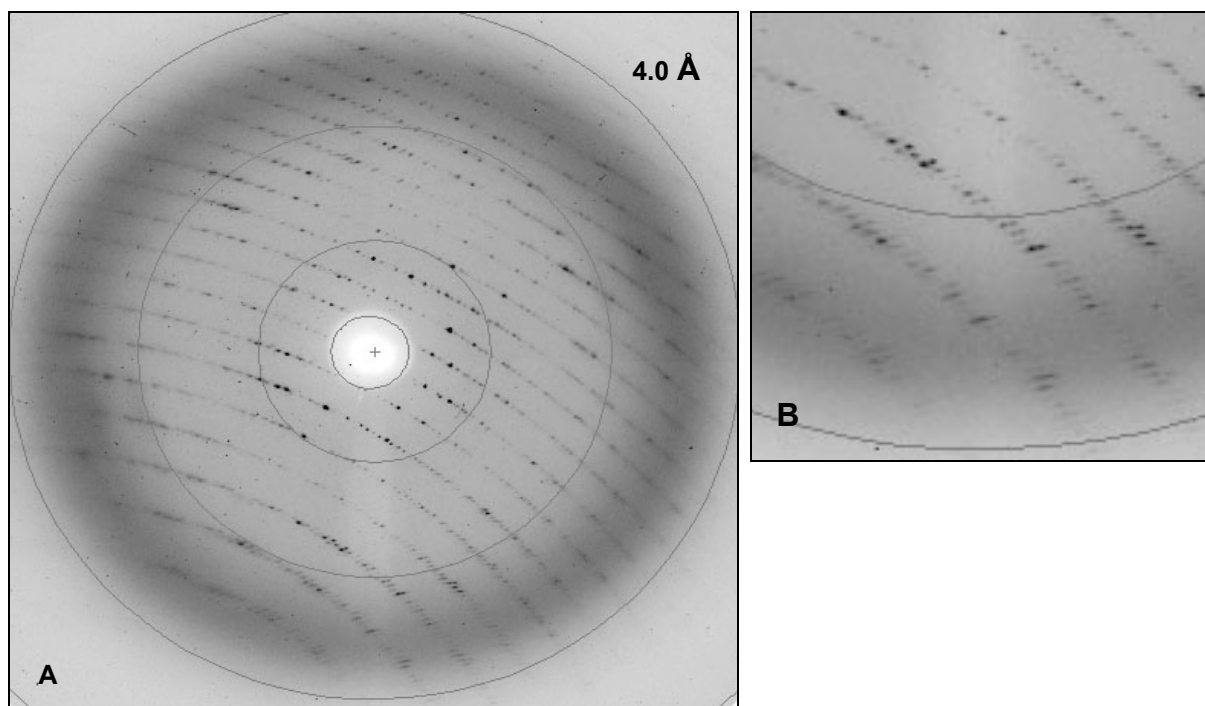


**Abb. 3.28: Kristalle der TTL19-Mutante**

**A)** TTL19-Kristalle aus Crystal Screen II/26 (0.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 M MES pH 6.5; 30 % PEG 5000) nach der Methode des sitzenden Tropfens bei 20°C. Kristalle der Mutante TTL21 zeigten unter derselben Bedingung den gleichen Habitus. **B)** Die Kristalloptimierung erfolgte nach der Methode des hängenden Tropfens bei 20 °C. Einkristalle wuchsen bei 28 % PEG 3350, 0.3 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1 M Na-Citrat pH 6.0, 12 mM ADP, 10 mM DTT.

Für die Datensammlung unter kryogenen Bedingungen mussten zunächst geeignete Kryoschutzmittel gefunden werden. Die Kristalle wuchsen überwiegend an Phasentrennungen, wobei eine Bestimmung der genauen Zusammensetzung der Phase, die den Kristall umgibt, nicht möglich war. Geeignete Kryobedingungen für solche Kristalle zu finden war daher besonders schwierig. Konventionelle Schutzmittel (PEG, MPD, Glycerol Paraffinöl, Ghee) erwiesen sich aufgrund der hohen Salzkonzentration und des ungünstigen PEG/Ammoniumsulfat-Mischverhältnisses im Mutterliqour als ungeeignet. Stattdessen wurden die Kristalle kurz in eine 30% PEG 3350 Lösung mit Hilfe eines Kryoloops transferiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt wurden. Einzelkristalle der Mutante TTL19 beugten Röntgenstrahlen auf der Heimanlage bis zu einer maximalen Auflösung von 3.3 Å. Obgleich die Kristalle optisch als Einkristalle eingestuft wurden, zeigte das Beugungsbild nur entlang einer Ausrichtung ein eindeutiges Beugungsmuster. Senkrecht dazu war jeder Reflex in viele kleinere Reflexe gespalten und zeigte deutlich, dass der Kristall doch aus mehreren Schichten bestand. Die Daten konnten daher nicht zur Röntgenstrukturanalyse verwendet werden. Abb. 3.29 zeigt eine charakteristische Aufnahme des Beugungsmusters eines Kristalls der Mutante TTL19.

Das Beugungsmuster lieferte jedoch die Zellparameter und Raumgruppe. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm *DENZO* (Otwinowski, 1993) indiziert und die geometrischen Parameter verfeinert. Unter Verwendung des *HKL Suite* Programms *SCALEPACK* erfolgte eine Skalierung der integrierten Aufnahmen (Otwinowski & Minor, 1997). Dies ergab für die TTL-Kristalle die monokline Raumgruppe  $P2_1$  mit den Zellparametern  $a = 47.28$ ,  $b = 195.33$ ,  $c = 91.92$  Å,  $\beta = 96.03^\circ$ . Die Bestimmung eines sinnvollen Matthews-Koeffizienten (Matthews, 1968) ist möglich unter der Annahme, dass vier Moleküle pro asymmetrische Einheit vorliegen. Dies entspricht einem Solvensgehalt von 49 % ( $V_M$ -Wert:  $2.43 \text{ Å}^3/\text{Da}$ ). Die Prozessierung des Datensatzes ist in Tabelle 3.8 zusammengefasst.



**Abb. 3.29: Beugungsmuster eines Kristalls der Mutante TTL19**

**A:** Das Beugungsmuster stellt eine Drehung von  $\Delta\phi = 0.5^\circ$  dar. Die Reflexe am Bildrand liegen bei einer Auflösung von 3.3 Å. **B:** vergrößerter Ausschnitt aus A zur Verdeutlichung der Anisotropie.

**Tabelle 3.8: Datensatz der TTL 19**

<b>Temperatur (K)</b>	100
<b>Wellenlänge (Å)</b>	1.54
<b>Raumgruppe</b>	P2 <sub>1</sub>
<b>Gitterkonstanten (a,b,c [Å], <math>\beta</math> [°])</b>	47.28, 195.33, 91.92, 96.03
<b>Auflösung (Å)</b>	40-3.3
<b>Mosaizität (°)</b>	2.0
<b>Anzahl gemessener Reflexe</b>	243843
<b>Redundanz</b>	1.3 (1.6)
<b>I/<math>\sigma</math> (I)</b>	6.06 (3.04)
<b>Vollständigkeit (%)</b>	63.1 (46.9)
<b>R<sub>merge</sub> (%)</b>	9.6 % (23.3)

Die Werte in den Klammern ( ) beziehen sich immer auf die Schale der höchsten Auflösung.

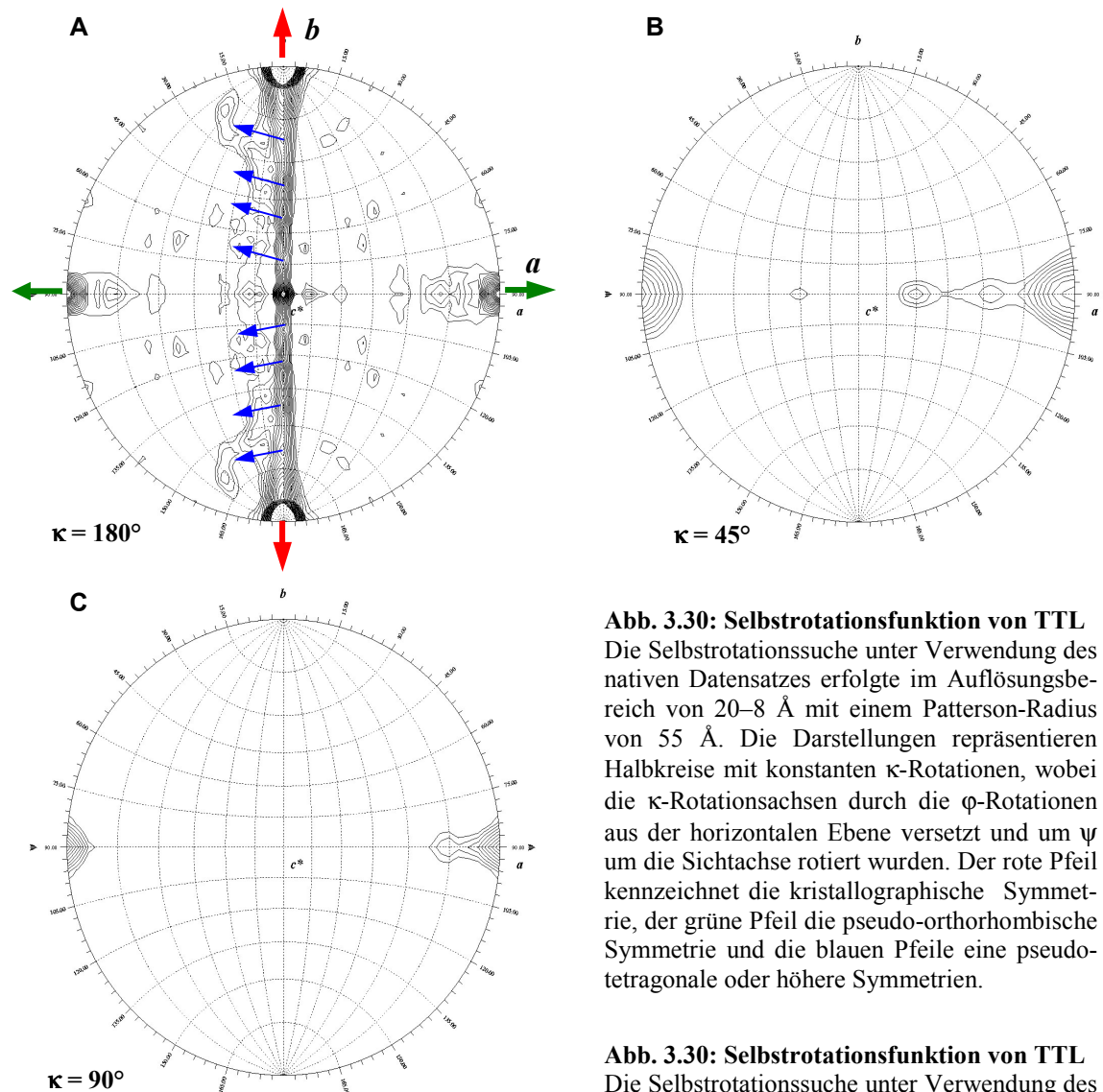
Zur Untersuchung der Rotationssymmetrie der Kristalle wurde mit dem Programm *GLRF* (Tong & Rossmann, 1997) eine Selbstrotationsfunktion gerechnet. Die Analyse der Selbstrotationsfunktion ergab neben der kristallographischen zweifachen, monoklinen Symmetrieachse parallel zu *b* zwei weitere nicht-kristallographische zweizählige Rotationssymmetrieachsen parallel zur *a* und zur *c*-Achse ( $\kappa=180^\circ$ ; Abb. 3.30 A). Die Kristallpackung ähnelt somit einem orthorhombischen System. Die monokline Schraubenachse (*b*-Achse) wäre im orthorhombischen System erhalten,

wodurch sich die Raumgruppe  $P2_X2_Y2_1$  ergäbe, wobei X und Y andeuten, dass diese zusätzlichen Schraubenachsen nachzuweisen wären.

Zusätzlich zum pseudo-orthorhombischen System deuteten weitere Maxima, obgleich wesentlich geringerer ausgeprägt, auf Achsen mit höherer Rotationssymmetrie hin. Die nächst „höchsten“ Maxima der Selbstrotationsfunktion sind in den Sektionen  $\kappa = 45^\circ$  und  $90^\circ$  zu beobachten (Abb. 3.30 B, C). Sie deuten auf eine vierzählige Rotationsachse hin, die parallel zur  $a$ -Achse ausgerichtet ist. Es liegt daher eine pseudo-tetragonale Packung vor mit senkrecht angeordneten zweizähligen Rotationsachsen (entlang  $b$  und  $c$ ). Die beschriebenen Symmetrieelemente würden eine  $P421$ -Packung ergeben, die keiner Raumgruppensymmetrie entspricht. Um eine  $P422$ -Packung zu erreichen, müssten in der  $bc$ -Ebene zwei weitere zweizählige Rotationssymmetrieachsen liegen,  $45^\circ$  gegen  $b$  und  $c$  verkippt. In der Tat sind in der  $\kappa = 180^\circ$  Sektion weitere Maxima in der  $bc$ -Ebene zu sehen. Sie sind jedoch nicht sauber bei  $\psi = 45^\circ$  lokalisiert. In Kombination mit der Schraubenachse entlang  $b$  ergibt sich eine pseudo- $P4_X2_12$ -Packung, wobei  $X = 1, 2$  oder  $3$  durch Auslöschungen zu definieren wäre.

Vier Monomere pro Elementarzelle erfüllen zudem die Anforderung einer pseudo-tetragonalen Packung. Eine degenerierte vierfache Rotationsachse resultiert in einer scheinbar achtfachen Rotationssymmetrie. Diese imperfekte vierfache Achse resultiert in einer ähnlichen imperfekten Positionierung der senkrechten zweifachen Achse der  $bc$ -Ebene, was zu den beobachteten verschmierten Reflexen führt. Physikalisch liegt die vierfache Rotationsachse parallel zur dominanten Kristallflächennormalen ausgerichtet. Da die Kristalle Stapel von dünnen Plättchen gleichen, ergibt sich nur dann ein definiertes Beugungsbild, wenn der Röntgenstrahl senkrecht auf die Plättchen trifft. Wird der Kristall hingegen so gedreht, dass der Röntgenstrahl parallel zu den Plättchen verläuft, ist durch die Satellitenreflexe (Abb. 3.29 B) zu erkennen, dass es sich nicht um einen Einkristall, sondern um mehrere leicht gegeneinander verkippte Kristalle handelt (Abb. 3.28 B). Aus diesem Grunde konnte trotz der Auflösung von  $3.3 \text{ \AA}$  kein auswertbarer Datensatz gemessen werden.





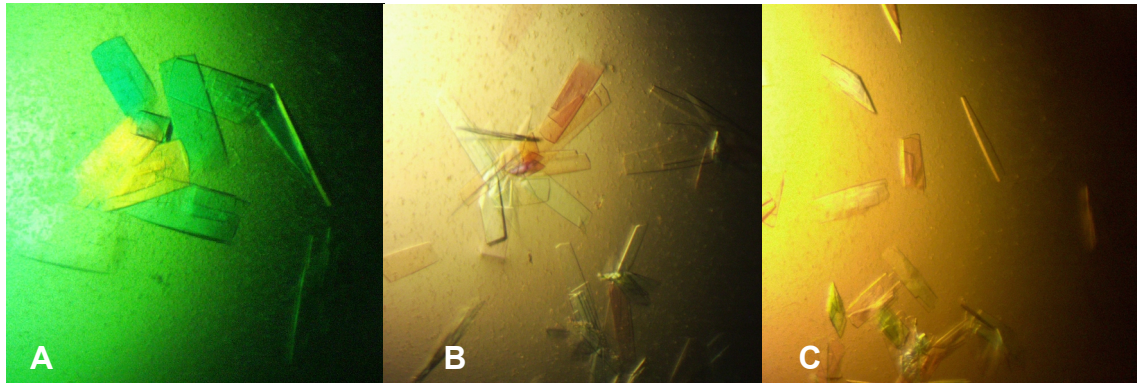
**Abb. 3.30: Selbstrotationsfunktion von TTL**

Die Selbstrotationssuche unter Verwendung des nativen Datensatzes erfolgte im Auflösungsbe-  
reich von 20–8 Å mit einem Patterson-Radius  
von 55 Å. Die Darstellungen repräsentieren  
Halbkreise mit konstanten  $\kappa$ -Rotationen, wobei  
die  $\kappa$ -Rotationsachsen durch die  $\varphi$ -Rotationen  
aus der horizontalen Ebene versetzt und um  $\psi$   
um die Sichtachse rotiert wurden. Der rote Pfeil  
kennzeichnet die kristallographische Symmetrie,  
der grüne Pfeil die pseudo-orthorhombische  
Symmetrie und die blauen Pfeile eine pseudo-  
tetragonale oder höhere Symmetrien.

**Abb. 3.30: Selbstrotationsfunktion von TTL**

Die Selbstrotationssuche unter Verwendung des  
nativen Datensatzes erfolgte im Auflösungsbe-

Zusätzlich wurden verschiedene Kristallisationsmethoden wie Mikrodialyse, das *Microbatch*-Verfahren auf einer Gel-Oberfläche unter Öl und Mikroanimpfen (*Microseeding*) zur Optimierung der Kristallform durchgeführt. Mittels Mikroanimpfen gelang es aus verwachsenen Plättchen Einkristalle zu erhalten. Hierfür wurden Kristallklumpen aus einem Kristallisationstropfen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Vortexen mikrokristalline Partikel hergestellt. Diese Kristallkeim-Stocklösung wurde mit der entsprechenden Reservirlösung 1:10 bzw. 1:100 verdünnt und jeweils 0.5 µL zu einem frisch angesetzten Kristallisationstropfen als Nukleationskeimlösung hinzugegeben. Innerhalb von drei Tagen konnten mit dieser Methode dünne Einkristalle gewonnen werden (Abb. 3.31 A-C). Eine längere Inkubation dieser Einkristalle führte allerdings grundsätzlich zu verwachsenen Plättchen. Röntgenaufnahmen dieser Kristalle zeigten, wie in Abb. 3.29, vergleichbare Beugungsbilder.



**Abb. 3.31: Kristalle der Mutante TTL19**

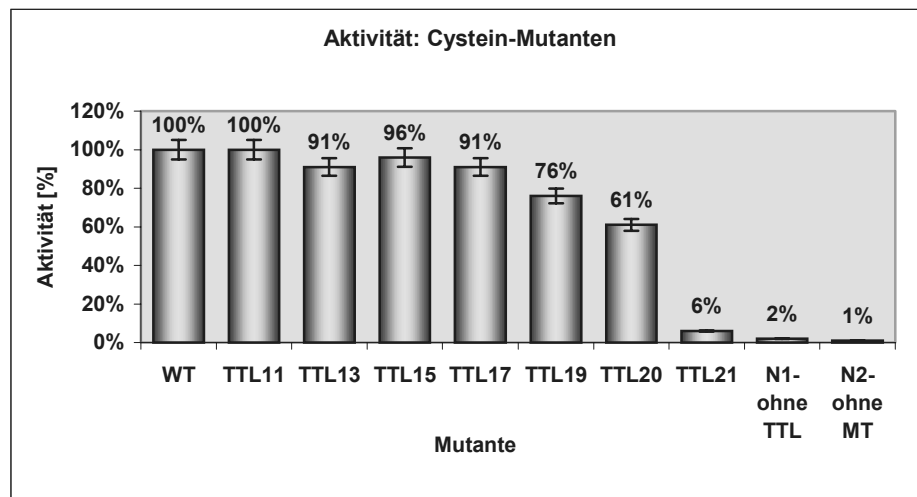
Diese Kristalle wurden durch Animpfen mit Mikrokristallen gewonnen. A: 0.15 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20% PEG 4000, 0.1 M Citratpuffer pH 6.0; B: 0.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 22% PEG 4000, 0.1 M Citratpuffer pH 6.0; C: 0.1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20% PEG 4000, 0.1 M Citratpuffer pH 6.0.

Da durch die Anwendung umfangreicher Kristallisations-Screens und Kristallisationsmethoden keine Verbesserung dieser Kristallform erreicht wurde, konnte die angestrebte Röntgenstrukturanalyse der TTL auf diesem Weg nicht erfolgen.

### 3.2.3 Aktivität der Cystein-Mutanten

Frühere Arbeiten zeigten, dass durch Modifizierung der TTL mit N-Ethyl-Maleinimid (NEM) das oxidationsempfindliche Enzym ein Cystein enthält, dass an der Katalyse beteiligt sein könnte (Rüdiger, 1994). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legten nahe, dass dafür Cys238 bzw. Cys244 in Frage kämen. Die Funktionsanalyse der Mutanten TTL1-7, in denen je ein Cystein gegen ein Serin ausgetauscht worden war, zeigte dass keiner der Austausche einen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzyms hatte (Ehinger, 2000).

Um zu Überprüfen, ob der multiple Austausch von Cysteinen gegen Serine einen Einfluss auf die katalytische Aktivität der TTL hat, wurden die Cystein-Mutanten in einem Aktivitätstest analysiert und mit dem Wildtyp-Protein verglichen. Der Test wurde mit GST-Fusionsprotein der TTL durchgeführt. Die N-terminal vorhandene GST-Fusionseinheit führt zu keinem Aktivitätsverlust des Enzyms (Ehinger, 2000). Die Konzentration der GST-Fusionsproteine in Lösung wurde mittels SDS-PAGE bestimmt. Für den Aktivitätstest wurde, basierend auf der Konzentrationsbestimmung mittels SDS-PAGE, die eingesetzte Konzentration (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) der GST-Fusionsproteine aufeinander abgestimmt. Es wurden drei Aktivitätsbestimmungen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 3.32 zusammengefasst sind.



Mutante	Ausgetauschte Cysteine
Wildtyp-TTL	-
TTL11	C 72, C238, C244
TTL13	C 72, C91, C238, C244
TTL15	C 72, C238, C244, C347
TTL17	C 72, C91, C238, C244, C347
TTL19	C 72, C91, C238, C244, C294, C347
TTL20	C 72, C91, C238, C244, C338, C347
TTL21	C 72, C91, C238, C244, C294, C338, C347

**Abb. 3.32: Aktivität der Cystein-Mutanten der TTL**

Der Aktivitätstest wurde wie unter Kap. 2.9.15.1 durchgeführt und wurde mittels Szintillationszähler ausgewertet. Zur Kontrolle wurde die spontane Zerfallsrate des Substrates L-[3,5-3H]-Tyrosin ohne Enzym bzw. ohne Mikrotubuli bestimmt. Der Standardfehler des Mittelwerts ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. In der dazugehörigen Tabelle sind die Cystein-Mutanten aufgeführt.

Die drei Mutanten TTL19, TTL20 und TTL21 wiesen im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine leicht bis deutlich reduzierte Aktivität auf. TTL21 war nahezu inaktiv. Aus diesen Daten war ersichtlich, dass ein gleichzeitiger Austausch der Cysteine 72, 91, 238, 244 und 347 zu keinem signifikanten Verlust der Aktivität führte (Mutante TTL17). Wurde jeweils das Cystein 294 bzw. Cystein 338 mit den Cysteinen 72, 91, 238, 244 und 347 ausgetauscht, verminderte sich die Aktivität um 24 % bzw. 39 %. Die Cystein-freie Mutante TTL21 hingegen, bei der zusätzlich die Cysteine 294 und 338 ausgetauscht wurden, zeigte einen nahezu vollständigen Aktivitätsverlust.

### 3.2.4. Stabilisierung und Kokristallisationsversuche der Mutante TTL19 im Komplex mit Fab-Fragmenten

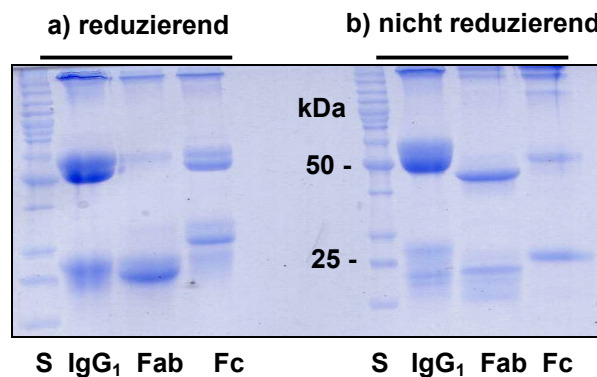
Vorangegangene Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die TTL trotz Austausch aller Cysteine relativ instabil ist und proteolytisch abgebaut wird. Die Abbaufragmente können nicht vom vollständigen Protein getrennt werden. Das Protein bildet somit auch im gespaltenen Zustand eine strukturelle Einheit.

Weiterhin zeigt die Morphologie der TTL19-Kristalle, dass die TTL-Moleküle zweidimensionale Schichten bilden, wobei günstige Packungskontakte in der dritten Dimension offensichtlich fehlen oder gestört sind. Die Spaltung der TTL könnte dafür eine mögliche Ursache sein.

Die Auswertung der N-terminalen Sequenzanalyse von TTL-Abbaufragmenten zeigt, dass besonders die Region zwischen den Resten 232-252 von Proteasen angegriffen wird, was zu einer Destabilisierung des Proteins führen kann. Im Rahmen dieser Arbeit stand der monoklonale Antikörper ID3 zur Verfügung, der das lineare Epitop zwischen AS<sub>252</sub>NYGKYE<sub>257</sub> der TTL unter nativen Bedingungen erkennt (Erck *et al.*, 2000). Da der Antikörper im Bereich der instabilen Region der TTL bindet, könnte seine Anwesenheit die TTL vor weiterem Abbau schützen und diese Region stabilisieren.

### a) Herstellung von Fab-Fragmenten

Monovalente, antigenbindende Fragmente (Fab-Fragmente) wurden durch proteolytische Spaltung mit Papain (24 h, 37°C) unter Verwendung des *Immuno Pure<sup>®</sup> Fab Preparation Kit* (Pierce) aus den vollständigen Antikörpern erzeugt. Die Trennung der Fab- und Fc-Fragmente erfolgte durch eine anschließende Protein G-Affinitätschromatographie. Fc-Fragmente wurden an die Protein G-Säule gebunden und verblieben dort, während monovalente Fab-Fragmente durchliefen und gesammelt werden konnten. Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurden alle Fraktionen in der SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht (Abb. 3.33).



**Abb. 3.33: SDS-PAGE der IgG<sub>1</sub>-Spaltung (ID3 Antikörper) mit Papain zur Herstellung von monovalenten Fab-Fragmenten.**

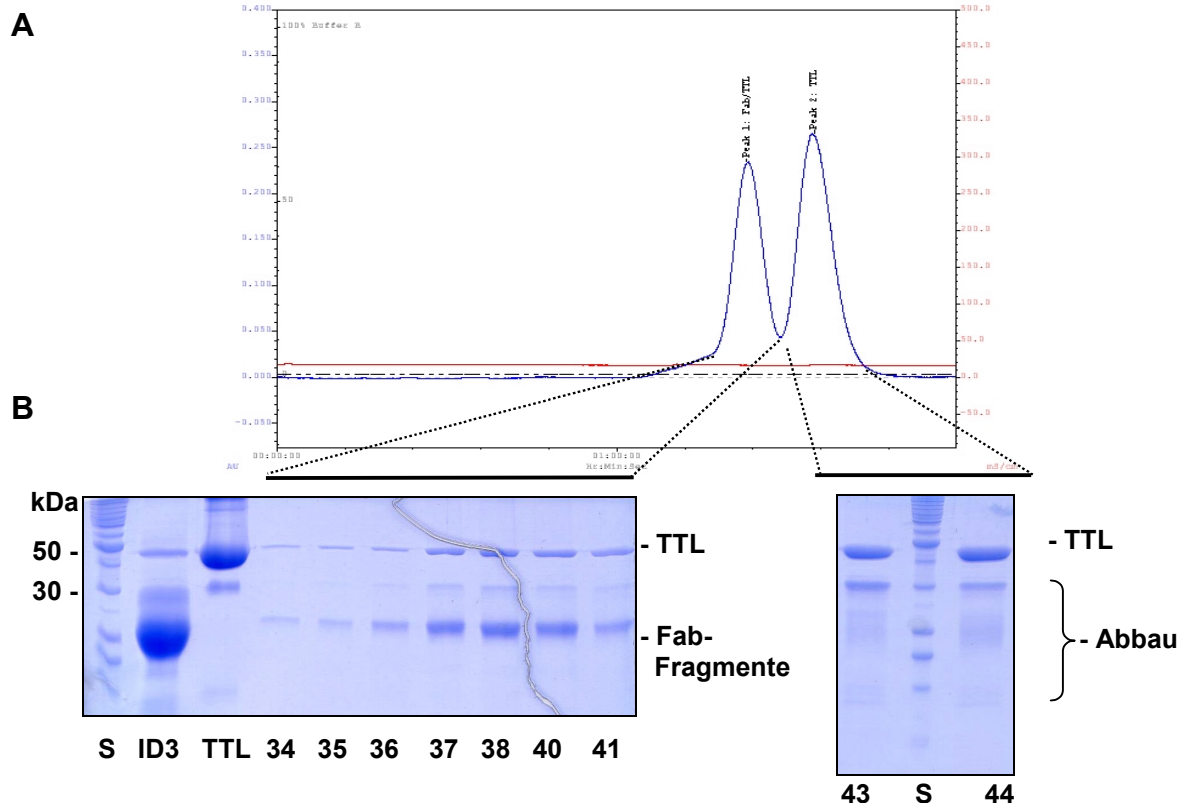
Die Fraktionen wurden unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE analysiert. **a)** IgG<sub>1</sub>: Antikörper vor dem Papain-Verdau (schwere Kette, 50 kDa; leichte Kette 26 kDa;); Fab: Fab-Fragmente nach Papain-Verdau: Fab-Fragmente, 25kDa; Fc:Fc-Fragmente nach Papain-Verdau: Fc-Fragmente, 30 kDa; **b)** Fraktion IgG<sub>1</sub>: Antikörper vor dem Papain-Verdau, Fraktion Fab-Fragment nach Papain-Verdau: Fab-Fragmente, 45kDa; Fraktion Fc-Fragmente nach Papain-Verdau: Fc-Fragmente, 27 kDa.

Die vorgereinigten Fab-Fragmente wurden anschließend mittels Anionenaustauschchromatographie und Gelpermeationschromatographie bis zur Homogenität gereinigt. Die reinen Fab-Fragmente wurden konzentriert und für Komplexierungsexperimente eingesetzt.

### b) Komplexisolierung

Zur Isolierung des Komplexes aus TTL und monovalenten ID3-Fab-Fragmenten wurden die Proteine zunächst gemischt und 30 min lang auf Eis inkubiert. TTL wurde hierbei im Überschuss zugesetzt, um eine vollständige Komplexierung mit Fab-Fragmenten zu erreichen. Anschließend wurde der Komplex mittels präparativer Gelpermeationschromatographie isoliert (Abb.3.34).

Fraktionen, die den reinen Komplex aus TTL und Fab-Fragmenten enthielten, wurden vereinigt, auf 8.5 mg/mL konzentriert und für weitere Experimente eingesetzt.



**Abb. 3.34: Isolierung des Komplexes aus TTL und den Fab-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers ID3**

TTL wurde in einem 2-fachen molaren Überschuss mit den Fab-Fragmenten ID3 30 min lang auf Eis inkubiert. Der Komplex wurde anschließend mittels GPC getrennt und isoliert. **A:** Chromatogramm der GPC. **B:** Fraktionen mit erhöhter Absorption bei 280 nm wurden mittels SDS-PAGE analysiert. S, Molekulargewichtsstandard in kDa, ID3: Fab-Fragmente vor der GPC, TTL: TTL vor der GPC, 34-41: Fraktionen aus Maximum 1, 43/44: Fraktionen aus Maximum 2.

Wie unter 3.2.2 erwähnt wurde, ist eine Lagerung der TTL bei 4 °C über einen Zeitraum von mehreren Wochen ohne Stabilitätsverlust nicht möglich. Die Anwesenheit von funktionell wichtigen Kofaktoren der TTL hat auf die Stabilität des Proteins in Lösung ebenfalls keinerlei Einfluss.

Es sollte nun getestet werden, ob die Anwesenheit von Fab-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers ID3 einen positiven Einfluss auf die Stabilität der TTL hat. Dazu wurden kleinere Volumina (100 µL, 8.5 mg/mL) des isolierten Komplexes über einen Zeitraum von mehreren Wochen auf Präzipitatbildung untersucht und mit unkomplexierter TTL verglichen (Tabelle 3.9).

**Tabelle 3.9: Untersuchung der Stabilität der TTL in An- bzw. Abwesenheit von Fab-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers ID3 während der Lagerung der 4°C**

Puffer	Fab-Fragmente	Beobachtung nach Reinigung	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen
20 mM Citratpuffer, pH 6.0, 10 mM DTT	ohne	keine Präzipitattbildung	keine Präzipitattbildung	Präzipitattbildung	starke Präzipitattbildung
20 mM Citratpuffer, pH 6.0	mit	keine Präzipitattbildung	keine Präzipitattbildung	keine Präzipitattbildung	keine Präzipitattbildung

Eine Präzipitattbildung des Komplexes wurde über den angegebenen Zeitraum nicht beobachtet. Es konnte erstmals eine stabile Proteinlösung erzeugt werden.

### c) Kokristallisationsversuche

Kristallisationsansätze des gereinigten Komplexes (8.5 mg/mL) wurden nach der Methode des „Sitzenden Tropfens“ mit verschiedenen Kristallisations-Screens bei 20 °C angesetzt. Um die Spaltung von Disulfidbrücken der monovalenten Fab-Fragmente zu vermeiden, erfolgten die Kristallisationsexperimente unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Proteinkristalle wurden unter keiner der getesteten Bedingungen beobachtet.

Die Analyse der Kristallisationstropfen zeigte jedoch deutlich, dass die sonst hohe Präzipitationsrate der unkomplexierten TTL auf 30-40 % verringert werden konnte. Die Löslichkeit der TTL konnte somit in Anwesenheit dieses Antikörpers wesentlich erhöht werden. Dieser Befund stand im völligen Einklang mit vorherigen Beobachtungen.

Weitere Kristallisationsversuche erforderten große Mengen des monoklonalen Antikörpers, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr zur Verfügung standen und waren daher nicht mehr möglich.

### 3.2.5 Kokristallisationsversuche der Mutante TTL19 mit C-terminalen Peptiden von $\alpha$ -Tubulin

Die TTL interagiert mit ihrem natürlichen Liganden  $\alpha\beta$ -Tubulin über die spezifische Bindung C-terminaler Aminosäuren von  $\alpha$ -Tubulin und besitzt zudem eine Bindungsstelle für  $\beta$ -Tubulin. Unter Verwendung von radioaktiv markiertem L-<sup>14</sup>C-Tyrosin zeigten Rüdiger *et al.* (1994), dass synthetische Peptide, die auf der C-terminalen AS-Sequenz von  $\alpha$ -Tubulin basieren, von der TTL erkannt und tyrosiniert werden. Dabei wird die minimale Erkennungssequenz E<sub>447</sub>GEE<sub>450</sub> benötigt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die TTL die höchste spezifische Aktivität bei Peptiden mit 12-15 AS der C-terminalen AS-Sequenz von  $\alpha$ -Tubulin aufweist.

Um einen detaillierten Einblick in die TTL/Tubulin-Interaktion zu erhalten, sollte versucht werden die TTL mit substratanalogen Peptiden kokristallisieren. Für Kokristallisationsversuche nach der Methode des sitzenden Tropfens bei 20°C wurden zwei synthetische Peptide mit einer Länge von 12 (Sequenz Ac-DSVEGEGEEGEE-carboxyl) bzw. 13 AS (Sequenz Ac-



VDSVEGEGEEGEE-amid) verwendet. Die Peptide wurden nach der Synthese HPLC-gereinigt und massenspektroskopisch analysiert (R. Frank; GBF).

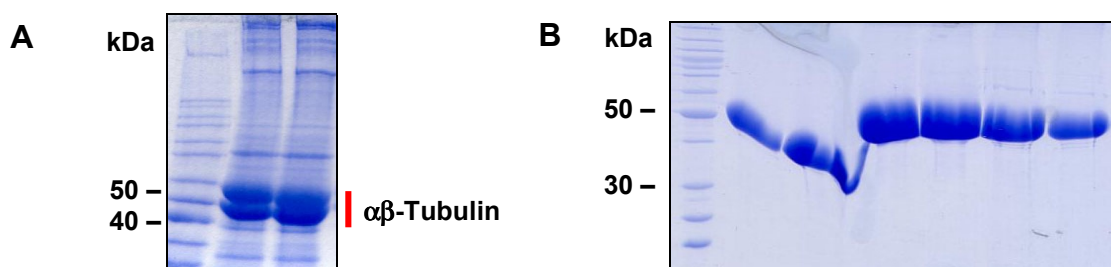
Die kristallisierbare Mutante TTL19 wurde mit beiden Peptiden in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt. Die Kokristallisationsexperimente erfolgten zunächst ohne Kofaktoren unter Verwendung verschiedener Kristallisations-Screens. Proteinkristalle konnten unter keiner der getesteten Bedingungen erhalten werden. Auch die Zugabe von funktionell wichtigen Kofaktoren (2.5 mM ATP bzw. ADP, 20 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) führte trotz Variation verschiedener Parameter (Temperatur, Proteinkonzentration) unter den getesteten Bedingungen nicht zur Kristallbildung.

### 3.2.6 Bindungsstudien und Kokristallisationsversuche der Mutante TTL19 mit $\alpha/\beta$ -Tubulin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Basis für die Strukturaufklärung mit der Isolierung und Kristallisation des Komplexes aus der TTL und  $\alpha/\beta$ -Tubulin begonnen. Für Bindungsstudien, der Überprüfung der Komplexstabilität und Kokristallisationsexperimente wurde aus gereinigtem neuronalem Tubulin detyrosiniertes Tubulin isoliert und für alle Versuche eingesetzt (Kap.2.9.6).

#### a) Präparation von $\alpha/\beta$ -Tubulin und dessen Subpopulationen aus Rinderhirn

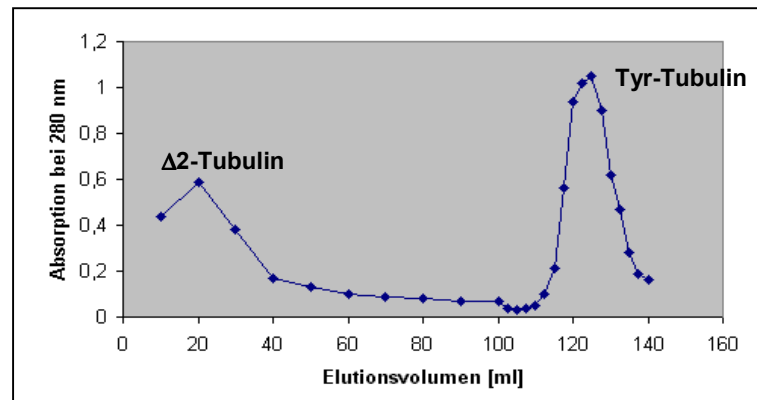
Das Gehirn von Säugetieren enthält MT-Mischpopulationen, die zu 50 % aus nicht-tyrosinierbarem  $\Delta 2$ -Tubulin, 15-20 % tyrosiniertem Tubulin (Tyr-Tubulin) und 30-35 % detyrosiniertem Tubulin (Glu-Tubulin) bestehen. Die Reinigung von  $\alpha/\beta$ -Tubulin und die Isolierung der Subspezies Glu-Tubulin erfolgte in Anlehnung an das Präparationsprotokoll von Paturle *et al.*, 1989 (Kap.2.9.6). Die Extraktion kältelabiler MT erfolgte in drei Polymerisations-/Depolymerisationszyklen aus Rinderhirnen. Reines Tubulin wurde anschließend mittels Phosphocellulose-Chromatographie von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen getrennt. Die entsprechenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (PC-Tubulin; Abb.3.35).



**Abb. 3.35: Reinigung von  $\alpha/\beta$ -Tubulin aus Rinderhirn**

SDS-PAGE Analysen: **A:** isolierte Mikrotubuli assoziiert mit MAPs aus Rinderhirnen; **B:** Tubulin-Frakturen (PC-Tubulin) nach der Phosphocellulose-Chromatographie zur Entfernung der MAPs.

Zur Isolierung möglichst großer Mengen Glu-Tubulin (detyrosiniertes Tubulin) wurde das PC-Tubulin zunächst unter Zugabe von TTL vollständig tyrosiniert (Kap. 2.9.6). Anschließend wurden Tyr-Tubulin und  $\Delta 2$ -Tubulin mittels Immunaффinitätschromatographie voneinander getrennt (Abb. 3.36).



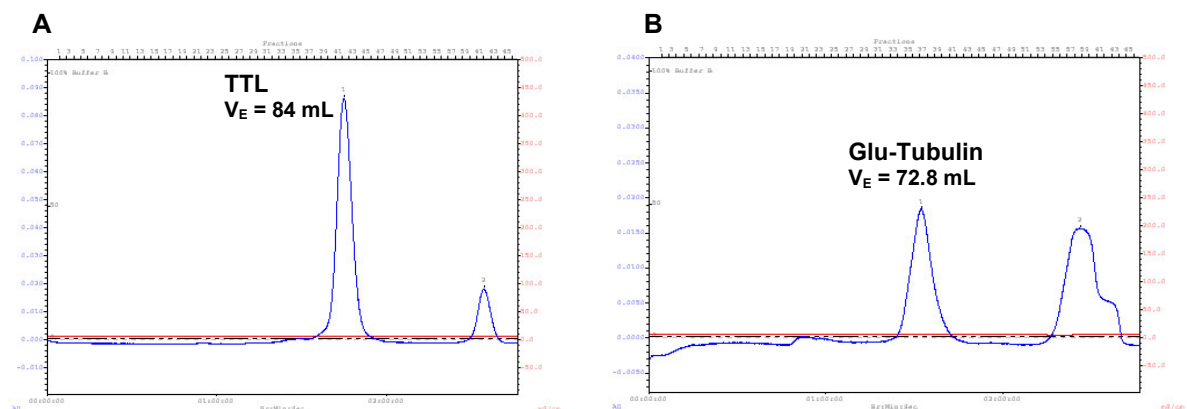
**Abb. 3.36: Immunaffinitätschromatographie von Tyr-Tubulin und  $\Delta 2$ -Tubulin**

Reines PC-Tubulin wurde maximal tyrosiniert und auf eine YL1/2 Immunaффinitätssäule geladen. Die Elution von  $\Delta 2$ -Tubulin erfolgte in Niedrigsalzpuffer (0,1 M KCl), während Tyr-Tubulin mit Hochsalzpuffer (0,8 M KCl) eluiert wurde.

Flavin *et al.* (1982) zeigten anhand von Aminosäureanalysen, dass unter Verwendung von Carboxypeptidase A das Tyrosin am C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin abgespalten werden kann, ohne dass das vorangehende Glutamat angegriffen wird. Somit wurde das isolierte Tyr-Tubulin durch eine Carboxypeptidase A (CPA)-Behandlung wieder vollständig detyrosiniert. Nach Inaktivierung der CPA (20 mM DTT) erfolgte die Isolierung der CPA mittels Gelfiltration. Gereinigtes Glu-Tubulin wurde auf 10 mg/mL Protein konzentriert und für nachfolgende Experimente eingesetzt.

### b) Untersuchung zur Komplexbildung und –stabilität von TTL und $\alpha/\beta$ -Tubulin

Um zwischen komplexierten und unkomplexierten Proteinen unterscheiden zu können, wurde zunächst für beide Proteine das jeweilige Elutionsvolumen ermittelt (Abb. 3.37).



**Abb. 3.37: GPC-Elutionsprofil von TTL bzw. Glu-Tubulin-Heterodimeren**

**A:** Elutionsprofil der TTL, das Elutionsvolumen von TTL (43 kDa) als monomeres Protein beträgt 84 mL; **B:** Elutionsprofil von  $\alpha/\beta$ -Tubulin, das Elutionsvolumen von Tubulin-Heterodimeren (110 kDa) beträgt 72,8 mL. (Elutionspuffer: 20 mM Na-Citratpuffer pH 6,0; Säule: Superdex 200 16/60)

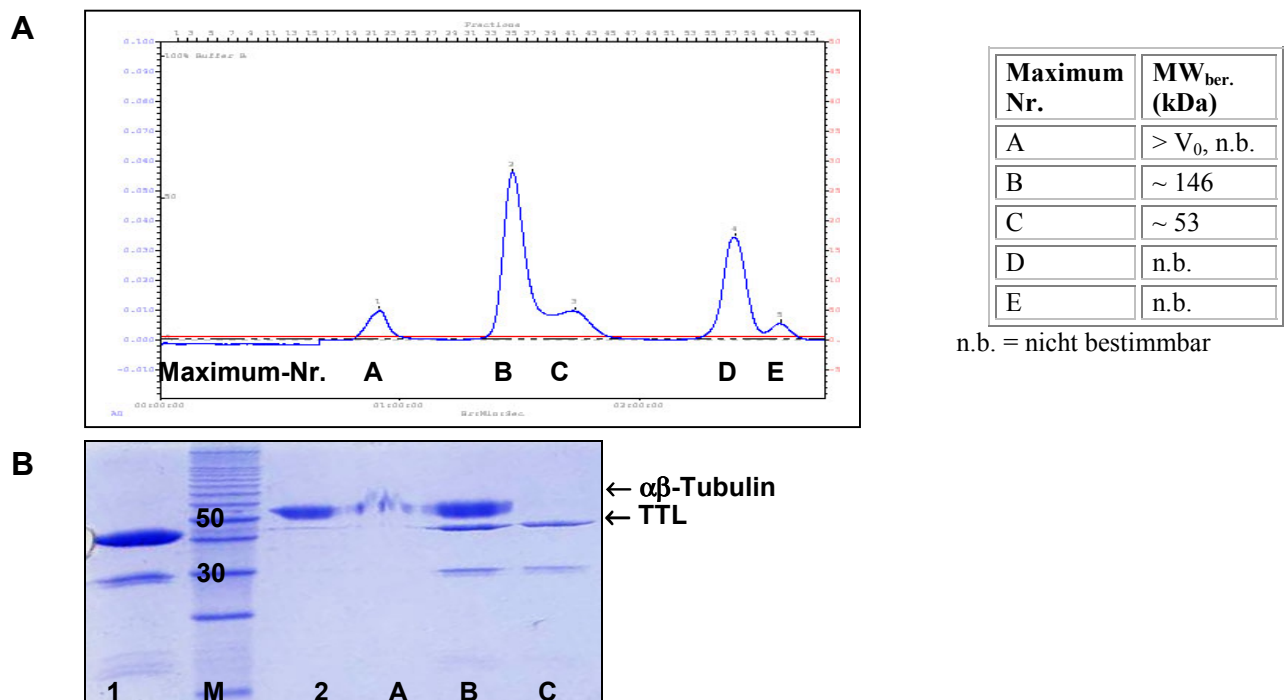
Anhand einer Kalibriergeraden für die verwendete Säule (Kap. 3.1.2) wurde das Molekulargewicht für beide Proteine bestimmt. Das Elutionsvolumen der TTL ( $V_E = 84$  mL) entsprach dabei einem Molekulargewicht von ca. 46 kDa, das des  $\alpha/\beta$ -Tubulins ( $V_E = 72,8$  mL) einem Moleku-



largewicht von ca. 119 kDa. Das ermittelte Molekulargewicht beider Proteine stimmte gut mit dem theoretischen Molekulargewicht von 43 bzw. 110 kDa überein. Zudem zeigte das Elutionsprofil von  $\alpha/\beta$ -Tubulin, dass zunächst unter den gewählten Pufferbedingungen keine Polymerisation zu Mikrotubuli oder kleineren Aggregaten stattfindet. Durch SDS-PAGE Analysen konnten weitere Absorptionsmaxima (Abb. 3.37), welche in beiden Elutionsprofilen im niedermolekularen Bereich lagen, als Proteinfragmente ausgeschlossen werden.

Anschließend wurde reine TTL mit detyrosiniertem Tubulin (Glu-Tubulin) in einem molaren Verhältnis von 1:1 vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bildung des Komplexes wurde mittels GPC analysiert (Abb.3.37 A). Protein-enthaltende Fraktionen aller GPC-Analysen wurden mittels SDS-PAGE untersucht (Abb.3.38 B).

Die TTL und auch  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurden sowohl in unkomplexierter Form (Abb.3.37 A: Maximum A: Tubulin, Maximum C: TTL) als auch im Komplex (Abb.3.38 A: Maximum B) eluiert. Das berechnete Molekulargewicht des Komplexes von ca. 146 kDa zeigte, dass es sich um eine 1:1-Stöchiometrie von TTL zu  $\alpha/\beta$ -Tubulin handelte. Ein geringer Anteil an Protein eluierte mit dem Ausschlussvolumen der Säule. Die SDS-PAGE Analyse dieser Fraktion zeigte, dass es sich hierbei um  $\alpha/\beta$ -Tubulin handelte, das demnach in polymerisierter bzw. aggregierter Form vorlag.

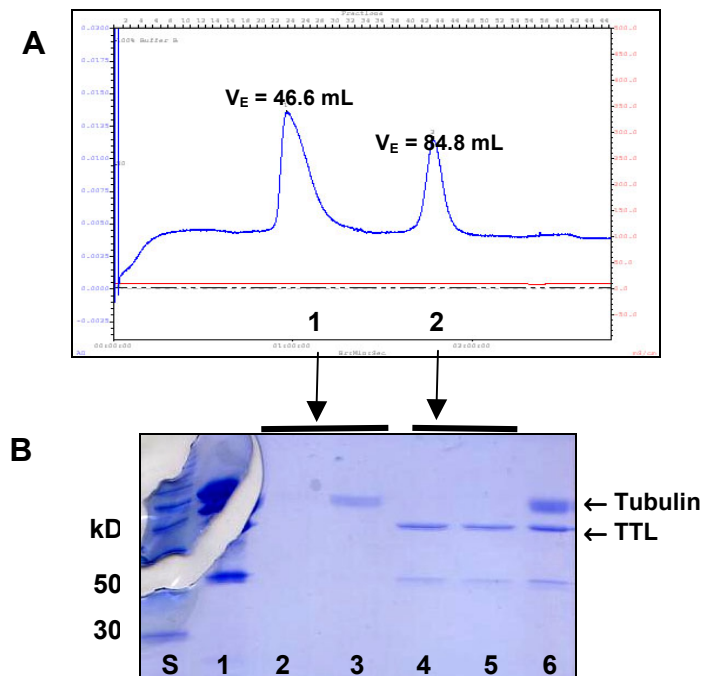


**Abb. 3.38: Elutionsprofil des TTL/Tubulin-Komplexes und SDS-PAGE Analyse der Protein-Fraktionen**

**A:** Chromatogramm der TTL/Tubulin Komplexisolierung mittels GPC (Säule: Superdex 200 16/60 p.g.; Puffer: 20 mM Citratpuffer pH 6.0). Die Nummerierung kennzeichnet eluierte Protein-Fraktionen aufsteigend nach ihrem Elutionsverhalten, beginnend mit dem geringsten Elutionsvolumen. In der dazugehörigen Tabelle wurden die berechneten Molekulargewichte der Peak-Fraktionen zusammengefasst. **B:** SDS-PAGE aller Maxima: 1: TTL (Abb. 3.33A), 2: Tubulin (Abb.3.33B), A: Maximum A (Abb.3.33A), B: Maximum B (Abb.3.33A), C: Maximum C (Abb.3.33A). Die Maxima D und E wurden nicht in der SDS-PAGE dargestellt.

Die vorangehende Komplexisolierung zeigte ein inhomogenes Elutionsprofil. Neben dem Komplex aus TTL und  $\alpha\beta$ -Tubulin, wurde darüber hinaus  $\alpha\beta$ -Tubulin in aggregierter Form beobachtet. Um zu untersuchen, ob Tubulin auch in Anwesenheit der TTL weiterhin aggregierte, wurde in einem nachfolgenden Experiment der zuvor isolierte Komplexes nach einer einwöchigen Lagerung bei 4°C erneut mittels GPC analysiert (Abb.3.39).

Diesmal zeigte die GPC-Analyse (Abb.3.39 A) zwei getrennte Absorptionsmaxima. Die SDS-PAGE Analyse der Fraktionen aus Maximum 1 und 2 mit erhöhter  $A_{280}$  zeigte, dass mit dem ersten Maximum nur  $\alpha\beta$ -Tubulin (Abb.3.39 B 3) und dem zweiten Maximum nur TTL (Abb.3.39 B 4/5) eluierten. Das berechnete Molekulargewicht für  $\alpha\beta$ -Tubulin entsprach einem Molekulargewicht von ca. 600 kDa und deutete erneut auf aggregierte  $\alpha\beta$ -Tubulin-Einheiten hin. Die Berechnung des Molekulargewichtes für die TTL ergab ca. 43 kDa. Beide Proteine lagen getrennt voneinander vor.



**Abb. 3.39: Stabilitätsuntersuchung des isolierten TTL/Tubulin-Komplexes**

Eine zuvor isolierte Komplexfraktion (6) wurde nach einer Woche Lagerung bei 4°C erneut mittels GPC untersucht. **A:** Chromatogramm der GPC. **B:** Fraktionen mit der höchsten Absorption bei 280 nm wurden mittels SDS-PAGE analysiert. S, Molekulargewichtsmarker in kDa, 1: konzentrierte Komplexfraktion vor der GPC, 2/3: Fraktionen aus Maximum 1, 4/5: Fraktionen aus Maximum 2, 6: isolierte Komplexfraktion Maximum B aus Abb. 3.37 A.

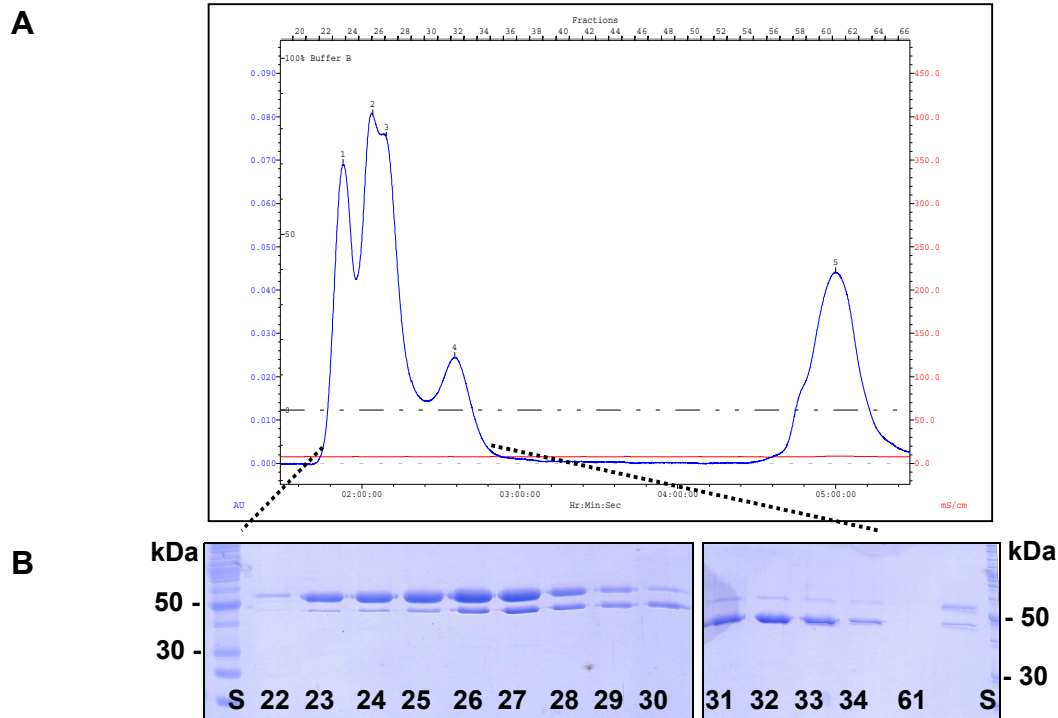
### c) Komplexisolierung in Anwesenheit des Polymerisationshemmers Disorazol A

Die vorherigen Ergebnisse ließen vermuten, dass das Aggregationsverhalten von  $\alpha\beta$ -Tubulin die Stabilität des gebildeten Komplexes ungünstig beeinflusste und somit möglicherweise zu einer Dissoziation des Komplexes führte. Folglich wurde der Versuch in Anwesenheit eines Polymerisationshemmers wiederholt.

Disorazol A aus *Sorangium cellulosum* hemmt sehr effektiv die Teilung tierischer und humaner Zellen. Immunofluoreszenzfärbungen von PtK2-Zellen zeigen, dass Disorazol A schon bei niedrigen Konzentrationen zu einem Abbau der Mikrotubuli führt (Elnakady, 2000). Weiterhin ist be-

kennt, dass Disorazol A die Polymerisation von Mikrotubuli *in vitro* hemmt und eine Depolymerisation induzieren kann. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass in Anwesenheit von Disorazol A keine die Bildung von Ringen oder ähnlichen MT-Strukturen stattfindet.

Der Komplex aus TTL und  $\alpha/\beta$ -Tubulin wurde in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  Disorazol A erneut mittels GPC isoliert (Abb. 3.40).

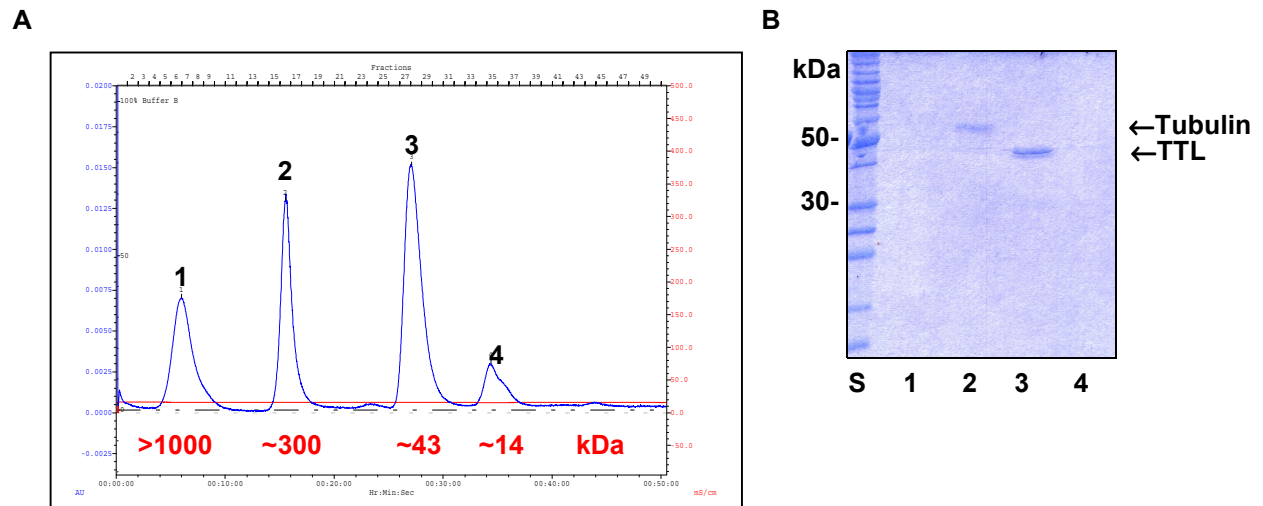


**Abb. 3.40: Elutionsprofil des TTL/Tubulin-Komplexes in Anwesenheit von Disorazol A und SDS-PAGE Analyse der Protein-Fractionen**

**A:** Chromatogramm der TTL/Tubulin Komplexisolierung mittels GPC (Säule: Superdex 200 16/60 p.g.; Puffer: 20 mM Citratpuffer pH 6.0) in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  Disorazol A. **B:** SDS-PAGE Analyse der GPC-Fractionen 22-34, S, Molekulargewichtsmarker.

Das Elutionsprofil zeigte vier Absorptionsmaxima im hochmolekularen Bereich (Abb. 3.40). Die anhand einer Kalibriergeraden (Kap. 3.1.2) berechneten Molekulargewichte für die Proteine entsprachen ca. 540 kDa für Absorptionsmaximum 1 (M1), ca. 150 kDa für Absorptionsmaximum 2/3 (M2/3) und ca. 50 kDa für Absorptionsmaximum 4 (M4). Die SDS-PAGE Analyse zeigte, dass M1 hauptsächlich aggregiertes  $\alpha/\beta$ -Tubulin, M2/3  $\alpha/\beta$ -Tubulin und TTL (1:1 Stöchiometrie) und M4 überwiegend TTL enthalten. Anders als erwartet schien  $\alpha/\beta$ -Tubulin auch in Anwesenheit hoher Konzentrationen des Polymerisationshemmers zu aggregieren. Durch die SDS-PAGE Analyse konnte ein weiteres Absorptionsmaximum (5), welches im Elutionsprofil im niedermolekularen Bereich lag, als Proteinfragment ausgeschlossen werden.

Der Komplex wurde erneut in einer zweiten GPC-Analyse untersucht. Fraktionen 26/27 der ersten GPC-Analyse wurden vereinigt und erneut analysiert (Abb. 3.41).



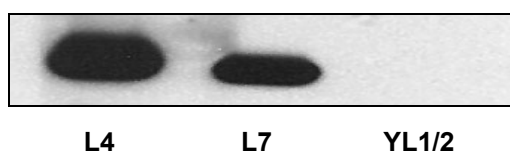
**Abb. 3.41: Interaktion von TTL und  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von Disorazol A.**

**A)** Elutionsprofil der zweiten GPC-Analyse. Die Zahlen unter dem Elutionsprofil geben das berechnete Molekulargewicht der Proteine der Absorptionsmaxima 1-4 in kDa an. **B)** SDS-PAGE Analyse der Peak-Fractionen 1-4.

Die Maxima 1 und 2 enthielten beide  $\alpha/\beta$ -Tubulin in aggregierter Form mit einem Molekulargewicht von >1000 kDa und ~300 kDa. Das Maximum 3 enthielt monomere TTL (43 kDa). Diese Ergebnisse demonstrierten, dass das Aggregationsverhalten von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit des Polymerisationshemmers Disorazol A nicht unterdrückt werden konnte. Dieser Effekt führt möglicherweise zu der beobachteten Dissoziation des Komplexes.

#### **d) Die Komplexbildung erfolgt unabhängig vom C-Terminus von $\alpha$ -Tubulin**

Der divergente C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin spielt bei der Komplexbildung zunächst keine Rolle. Dies zeigte die immunchemische Analyse einer isolierten Komplexfraktion aus TTL und PC-Tubulin. Für diesen Versuch wurde die TTL mit detyrosiniertem PC-Tubulin, das neben Glu-Tubulin auch  $\Delta 2$ -Tubulin enthält, vermischt. Der Komplex wurde, wie oben beschrieben, mittels GPC isoliert. Komplexfraktionen wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und mit monoklonalen Antikörpern gegen Glu-Tubulin (Antikörper L4),  $\Delta 2$ -Tubulin (Antikörper L7) und Tyr-Tubulin (Antikörper YL1/2) inkubiert (Abb.3.42).



**L4: IgG gegen Glu-Tubulin**  
**L7: IgG gegen  $\Delta 2$ -Tubulin**  
**YL1/2: IgG gegen Tyr-Tubulin**

**Abb. 3.42: Immunologische Analyse des isolierten Komplexes aus TTL und PC-Tubulin**

Fractionen des isolierten Komplexes wurden auf eine PVDF-Membran transferiert und mittels spezifischer Antikörper gegen den unterschiedlich modifizierten C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin analysiert.

### e) Kokristallisationsversuch des TTL/ $\alpha\beta$ -Tubulin-Komplex

Für Kokristallisationsversuche wurde der Komplex aus TTL und Glu-Tubulin mittels GPC isoliert. Fraktionen die ausschließlich beide Proteine in einer 1:1 Stöchiometrie enthielten wurden vereinigt und auf 8 mg/mL Protein konzentriert. Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Methode des „Sitzenden Tropfens“ mit verschiedenen Kristallisations-Screens bei 20°C bzw. 4°C. In Anwesenheit aller funktionell wichtigen Kofaktoren (ATP, L-Tyrosin und  $Mg^{2+}$ ) würde die Umsetzung von  $\alpha\beta$ -Tubulin sofort erfolgen. Somit könnte die Anwesenheit eines nicht hydrolysierbaren Inhibitors, wie AMP-PNP, diesen Prozess verhindern. Nach Isolierung des Komplexes wurden dementsprechend verschiedene Kofaktoren (Tabelle 3.10) sofort zur konzentrierten Proteinlösung zugefügt und für Kristallisationsversuch eingesetzt. Proteinkristalle wurden trotz Variationen verschiedenster Parameter (Proteinkonzentration, Fällungsmittelkonzentration) nicht erhalten.

**Tabelle 3.10: Kokristallisation der TTL mit Glu-Tubulin**

Komplex [mg/mL]	Kofaktoren
TTL + Glu-Tubulin , 8 mg/mL	-
TTL + Glu-Tubulin , 8 mg/mL	3 mM ADP
TTL + Glu-Tubulin , 8 mg/mL	3 mM ADP, 5 mM $Mg^{2+}$ , 20 mM KCl
TTL + Glu-Tubulin , 8 mg/mL	3 mM AMP-PNP
TTL + Glu-Tubulin , 8 mg/mL	3 mM AMP-PNP, 5mM $Mg^{2+}$ , 20 mM KCl
TTL + Glu-Tubulin , 3.5 mg/mL	3 mM AMP-PNP
TTL + Glu-Tubulin , 3.5 mg/mL	3 mM AMP-PNP, 5mM $Mg^{2+}$ , 20 mM KCl

## 4. Diskussion

### 4.1. Die $\alpha$ -Enolase aus *Streptococcus pneumoniae*

#### 4.1.1 Die $\alpha$ -Enolase – ein „moonlighting“-Enzym

„Jedes Gen steht für ein Protein, und dieses Protein hat eine einzige Funktion...“- diese Aussage trifft mittlerweile für viele Proteine nicht mehr zu. Die Klasse der „moonlighting“-Proteine („Schwarzarbeiter“), umfasst Proteine, die mehrere Funktionen ausüben können. Die Funktion kann je nach Lokalisation innerhalb der Zelle, nach Zelltyp und nach Quartärstruktur des Proteins variieren (Jeffrey, 1999).

Das Glykolyseenzym  $\alpha$ -Enolase, ist ein solches „moonlighting“-Enzym.  $\alpha$ -Enolasen sind über ihre glykolytische Funktion hinaus unter anderem als Hitzeschock-Proteine und Myc-bindende Proteine bekannt (Iida & Yahara, 1985; Subramanian & Miller, 2000).  $\alpha$ -Enolasen stehen im Zusammenhang mit vielen pathologischen Prozessen wie der Tumorbildung und -metastasierung (Miles *et al.*, 1991; Redlitz *et al.*, 1995). Darüber hinaus sind sie an der Pathogenese invasiver Bakterien beteiligt (Pancholi & Fischetti, 1998).

Die Invasion pathogener Bakterien, oder aber die Metastasierung von Tumorzellen, steht dabei im direkten Zusammenhang mit der  $\alpha$ -Enolase. Sowohl eukaryontische als auch prokaryontische Zellen nutzen die oberflächenlokalisierte  $\alpha$ -Enolase zum Erwerb proteolytischer Aktivität in der Nähe der Zelle, die eine wichtige Voraussetzung für die Migration durch Gewebe ist (Miles *et al.*, 1991; Pancholi & Fischetti, 1998). Erst eine lokale Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) bzw. Basalmembranen (BM) ermöglicht den Zellen eine Penetration in tiefere Gewebeschichten oder sogar in den Blutstrom. Die oberflächenlokalisierte  $\alpha$ -Enolase ermöglicht als Rezeptor für das humane Plasminogen, dem Zymogen der Serin-Protease Plasmin, eine lokale Konzentration potentieller proteolytischer Aktivität auf der Zelloberfläche von Tumorzellen oder pathogenen Bakterien. Eine Aktivierung zu Plasmin durch physiologische Plasminogen-Aktivatoren führt zum Abbau der ECM, wodurch letztendlich die Invasion und/oder Migration eingeleitet wird (Lähteenmaki *et al.*, 2001).

Im Zusammenhang mit pathogenen Mikroorganismen wurde die Plasminogen-bindende Funktion der  $\alpha$ -Enolase (SEN, *streptococcal surface enolase*) erstmals für *Streptococcus pyogenes* erwähnt (Pancholi & Fischetti, 1998). Inzwischen wurden eine Reihe anderer pathogener Organismen, wie *Aeromonas hydrophila* (Sha *et al.*, 2003), *Onchocerca volvulus* (Jolodar *et al.*, 2003) und *Pneumocystis carinii* (Fox & Smulian, 2001), beschrieben, die alle gemeinsam eine oberflächenlokalisierte  $\alpha$ -Enolase aufweisen, die Plasminogen bindet. Gleichermäßen wurde die Plasminogen-Bindung der  $\alpha$ -Enolase von *Streptococcus pneumoniae* detailliert untersucht (Bergmann *et al.*, 2001; 2003). Die  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* zeigt 96 % Sequenzidentität zur SEN aus *S. pyogenes* und ist ebenfalls auf der Zelloberfläche lokalisiert.

Bis heute ist nicht geklärt, wie eukaryontische und prokaryontische  $\alpha$ -Enolasen an die Zelloberfläche transportiert werden und wie sie dort verankert sind. Elektronenmikroskopische Studien an Ultradünnschnitten von Pneumokokken zeigten, dass die  $\alpha$ -Enolase zusätzlich zum Zytoplasma an der Innenseite der Zellmembran, in einzelnen Zellwandschichten und an der Oberfläche von unbekapselten sowie bekapselten Stämmen lokalisiert ist (Bergmann *et al.*, 2001; Abb.1.3). Diese Beobachtungen deuten auf einen Sekretionsmechanismus für die  $\alpha$ -Enolase hin. In der Aminosäuresequenz der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* konnten jedoch keine charakteristischen Signalepeptide oder typische Protease-Spaltstellen für bisher bekannte Sekretionssysteme identifiziert werden. Weiterhin fehlen charakteristische hydrophobe Bereiche zur Membranintegration bzw. spezifische Motive, wie LPXTGX oder LXXC, die der Proteinverankerung in der Zellwand grampositiver Mikroorganismen dienen (Bergmann *et al.*, 2001; Navare & Schneewind, 1999).

Muskelspezifische  $\alpha$ -Enolasen sind im Zytoplasma Bestandteil von Multiproteinkomplexen und assoziieren dort mit anderen Enzymen der Glykolyse, wie Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH), Pyruvatkinase, Phosphoglyceratmutase und Aldolase, und können so effizientere Reaktionskomplexe bilden (Arza *et al.*, 1997; Merkulova *et al.*, 1997). Neben der  $\alpha$ -Enolase konnten mittels immunchemischer Analysen weitere Glykolyseenzyme, wie z.B. die GAPDH, als Plasminogen-Bindungsproteine auf der Oberfläche von Streptokokken identifiziert werden (Winram & Lottenberg, 1998; Pancholi & Fischetti, 1998). Elektronenmikroskopische Studien mit spezifischen Antikörpern gegen die GAPDH bestätigten die Lokalisation an der Zelloberfläche (Bergmann, 2003). Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass Glykolyseenzyme, ähnlich wie im Zytoplasma, in größeren Komplexen auf der Zelloberfläche vorliegen, in denen eine Komponente die direkte Bindung an die Zelloberfläche vermittelt, während weitere Proteine daran assoziiert vorliegen.

Die  $\alpha$ -Enolase gilt folglich als ein potentieller Virulenzfaktor, mit dessen Hilfe es zu einer Ausbreitung von Streptokokken im Wirt kommen kann (Pancholi & Fischetti, 1998; Bergmann *et al.*, 2001). Um diesen ungewöhnlichen Infektionsprozess strukturell charakterisieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Kristallisation und Strukturanalyse der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* durchgeführt. Die räumliche Lokalisation der bekannten Plasminogen-Bindungsstellen und Interaktionsstudien mit Plasminogen bzw. Plasminogenteilfragmenten, im Zusammenhang mit veröffentlichten Daten, ermöglichten zudem Rückschlüsse auf den molekularen Bindungsmechanismus.

#### 4.1.2 Die Struktur der $\alpha$ -Enolase aus *Streptococcus pneumoniae*

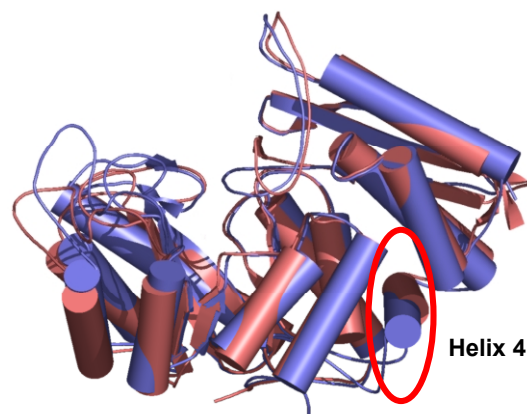
Die Struktur der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* wurde in der vorliegenden Arbeit durch Molekularen Ersatz unter Verwendung der Struktur der  $\alpha$ -Enolase aus *E.coli* als Suchmodell bei einer maximalen Auflösung von 2.0 Å gelöst. Das  $\alpha$ -Enolasemonomer setzt sich aus zwei Domänen zusammen. Die kleinere N-terminale Domäne besteht aus einem dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -

Faltblatt mit kurzen Schleifen, gefolgt von vier  $\alpha$ -Helices. Die größere C-terminale Domäne bildet ein TIM-Barrel mit einer  $\beta\beta\alpha\alpha(\beta\alpha)_6$ -Topologie (Abb 3.9 und 3.10).

Die  $\alpha$ -Enolasen aus *S. pneumoniae*, *E. coli*, Hummer und Hefe wiesen bei Sequenzidentitäten von 56% (*E. coli*), 43 % (Hummer) und 45 % (Hefe) eine nahezu identische Tertiärstruktur mit geringen Abweichungen auf (Abb. 3.12).

Die biochemische Charakterisierung und Röntgenstrukturanalyse der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* zeigten, im Gegensatz zu eukaryontischen  $\alpha$ -Enolasen und der  $\alpha$ -Enolase aus *E.coli*, eine oktamere Quartärstruktur (Abb.3.13). Alle Monomere sind so angeordnet, dass die C-terminalen Domänen einen äußeren Ring bilden, während die N-terminalen Domänen im Inneren liegen. Eine vergleichbare Quartärstruktur wurde anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen der  $\alpha$ -Enolase aus *Thermotoga maritima* beschrieben, und bestätigt damit die strukturellen Ergebnisse dieser Arbeit (Schurig *et al.*, 1995).

Brown *et al.* postulierten 1998, dass eine verlängerte  $\alpha$ -Helix 4 in dimeren  $\alpha$ -Enolasen, die die N-terminale Domäne mit der C-terminalen Domäne verbindet, zu sterischen Konflikten führen soll und dadurch die Oktamrisierung dimerer  $\alpha$ -Enolasen verhindern würde. Die Überlagerung der Strukturen der  $\alpha$ -Enolasen aus *S. pneumoniae* (rosa) und Hefe (blau) in Abb. 4.1 zeigt deutlich den Längenunterschied der  $\alpha$ -Helix 4.



**Abb. 4.1:** Überlagerte Strukturen der  $\alpha$ -Enolase-Monomere aus *S. cerevisiae* (blau) und *S. pneumoniae* (rosa). Gekennzeichnet (roter Kreis) ist die unterschiedlich lange Helix 4 der N-terminalen Domäne.

Wie aus Abb. 4.2 (rot) hervorgeht, werden die Hauptkontakte zwischen zwei Dimeren der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* durch Reste der  $\alpha$ -Helices 2-4 bzw. der Schleife H4-S4 der N-terminalen Domäne, sowie durch Reste der  $\alpha$ -Helix 10 und nachfolgenden Schleifen der C-terminalen Domäne, vermittelt.

Der strukturbasierte Sequenzvergleich zeigt weiterhin, dass die oktamere  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* und auch andere oktamere  $\alpha$ -Enolasen, im Gegensatz zu den dimeren  $\alpha$ -Enolasen aus Hefe, Hummer und Mensch, eine Deletion von 3-5 AS am Ende der vierten  $\alpha$ -Helix 4 (AS 136-143) aufweisen. Zusätzlich ist der C-Terminus der  $\alpha$ -Helix 4 in oktameren  $\alpha$ -Enolasen durch zwei aufeinanderfolgenden Glycine (Tandem-Glycine) gekennzeichnet.



	H2				H3				
	83	90	100	110	120				
<i>S.pneumoniae</i>	.DVRD	QQAID	RAMIAL	DGTPNKGKLGANAILGV	SIAVARAAD	YLEIP			8
Human alpha	LNVTE	QEKIDKLM	EMDGTENKSKFGANAILGV	SLAVCKAGAVEK	GVP				2
Hefe	LDVKD	QKAVDDFL	SLDGTANKSKLGANAILGV	SMAAARAAA	EKNVP				2
Hummer	LKVTQ	QKECDEFM	CKLDGTENKSSLGANAILGV	SLAICKAGAAE	LGIP				2
<i>E.coli</i>	.DAKD	QAGIDKIM	IDLDGTENKSKFGANAILAV	SLANAKAAAA	AKGMP				2
<i>B.subtilis</i>	.DVTE	QNAIDQLL	IELDGTENKSKLGANAILGV	SMACARAAAD	FLQIP				8
<i>Zymomonas</i>	.EAED	QELIDQTM	IKLDGTPNKGKFGANAILGV	SLAVAKAAAE	ARGLP				8
<i>T.maritima</i>	.NAFD	QPLVDKTL	IELDGTENKSKLGANAILAV	SMAVARAAAN	YLGLP				8

	H4 H4-S4 Loop				S4				
	130	140	150	160					
<i>S.pneumoniae</i>	LYSVLG	...GFN	..TKVLP	TPMMNIINGGSHSDAPIAFQ					8
Human alpha	LYRHIAD	LAGNS	..EVILPVP	AFNVIINGGSHAGNK	LAMQ				2
Hefe	LYQHLAD	LSKSKTSPYVLPVP	PFLNVLNGGSHAGG	ALALQ					2
Hummer	LYRHIAN	LANYD	..EVILPVP	AFNVIINGGSHAGNK	LAMQ				2
<i>E.coli</i>	LYEHIAE	LNGTPG	.KYSMPVPM	MMNIINGGEHADN	NNVDIQ				2
<i>B.subtilis</i>	LYQYLG	...GFN	..SKTLPVP	MMNIVNGGEHADN	NNVDIQ				8
<i>Zymomonas</i>	LYRYVG	...GTA	..AHVLPVP	MMNIVNGGMHADN	PIDFQ				8
<i>T.maritima</i>	LYKYL	...GVN	..AKVLPVP	LMNVIINGGQHADN	NLDLQ				8

**Abb. 4.2:** Sequenzvergleich der Reste 83-163 (basierend auf der  $\alpha$ -Enolase-Aminosäuresequenz aus *S. pneumoniae*) für  $\alpha$ -Enolasen (Eukaryonten, Prokaryonten und Eubakterien) mit bekannter Quartärstruktur. Die AS 86-163 umfassen Helix 2 (AS 87-97), Helix 3 (AS 108-126), Helix 4 (AS 130-135), den Loop zwischen Helix 4 und Strang 4 (H4-S4 Loop, AS 136-143) und Strang 4 (AS 144-150) der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae*. Die von Brown *et al.* vorhergesagten Bereiche, die an Dimer/Dimer-Kontakten beteiligt sein sollen, sind gelb unterlegt. Die AS, die an der Dimer/Dimer-Interaktion der oktameren  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* beteiligt sind, sind rot unterlegt. Punkte stellen AS-Deletionen dar, um den Vergleich auf homologe Positionen abzugleichen. Blau unterlegte Glycin-Reste kennzeichnen zwei Tandem-Glycine. Die Zahlen hinter den Sequenzen: 2 = Dimer, 8 = Oktamer.

Die strukturellen Daten dieser Arbeit bestätigen damit die Hypothese von Brown *et al.* (1998). An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass die Tertiärstruktur der oktameren  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* nicht signifikant von  $\alpha$ -Enolasen, die kein Plasminogen binden, abweicht. Oktamere  $\alpha$ -Enolasen besitzen eine verkürzte  $\alpha$ -Helix 4, die an Dimer/Dimer-Kontakten zur Ausbildung des Oktamers beteiligt ist und welche am Ende durch zwei aufeinanderfolgende Glycine geprägt ist. Eine Insertion von 3-5 Aminosäuren am Ende dieser  $\alpha$ -Helix ist der Grund für die ausbleibende Oktamerisierung dimerer  $\alpha$ -Enolasen.

#### 4.1.3 Die Plasminogenbindestellen der $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae*

Die Interaktion zwischen Plasminogen und natürlichen Liganden, wie z.B. Fibrinogen, erfolgt über die Lysinbindestellen innerhalb der fünf Kringle des humanen Plasminogens und den carboxyterminal bzw. intern gelegenen Lysinen des Rezeptors (Marschall *et al.*, 1994).

Die humane  $\alpha$ -Enolase, die im Zusammenhang mit der Migration von Tumorzellen steht, bindet Plasminogen über ein C-terminales Lysin (Miles *et al.*, 1991). Die proteolytische Abspaltung des endständigen Lysins der humanen  $\alpha$ -Enolase führt zu einem vollständigen Verlust der Rezeptorfunktion (Miles *et al.*, 1991; Redlitz *et al.*, 1995). Die Plasminogenbindung humaner  $\alpha$ -Enolasen erfolgt somit ebenfalls über einen lysinabhängigen Mechanismus.

Die Plasminogen-bindenden  $\alpha$ -Enolasen von *S. pyogenes* und *S. pneumoniae* weisen sogar zwei endständige Lysine auf, deren Abspaltung jedoch nur zu einer Reduktion der Plasminogen-Bindung führt (Bergmann *et al.*, 2001; Pancholi & Fischetti, 1997). Auch Deletionen der endständigen Lysine oder Substitutionen gegen Leucine führen nur zu einer Reduktion der Plasminogenbindung (Bergmann *et al.*, 2003). SPOT-Membran-Analysen der gesamten  $\alpha$ -Enolase-Aminosäuresequenz zeigten, dass ein Nonapeptid mit der Aminosäureabfolge FYDKERKVVY an den Positionen 248 bis 256 innerhalb der  $\alpha$ -Enolase-Sequenz spezifisch mit Plasminogen reagiert (Bergmann *et al.*, 2003). Systematische Substitutionen jeder Aminosäure des internen Motivs mit allen 20 Aminosäuren ergaben, dass besonders die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin (F248, Y249, Y256) und negativ geladene Glutamin- und Asparaginsäuren (E252, D250) eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, während die Substitutionen der Lysine (K251, K254) dagegen *in vitro* keinen Einfluss auf die Plasminogenbindung haben (Bergmann, 2003).

Synthetische Peptide, die im Gegensatz zum Wildtyp-Peptid FYDKERKVVY Aminosäuresubstitutionen des Asp an Position 3 (Asp→Ala; Peptid FYAKERKVVY) bzw. der Lysine an Position 4 und 7 (Lys→Leu) und der Glutaminsäure an Position 5 (Glu→Gly; Peptid FYDLGRLVY) enthalten, inhibieren die Bindung von radioaktiv-markiertem Plasminogen an Pneumokokkenzellen nicht (Bergmann *et al.*, 2003). Weiterhin zeigten Infektionsstudien an einem Mausmodell, dass Pneumokokken die eine  $\alpha$ -Enolase-Doppelmutante mit den Substitutionen Lys251Leu, Lys254Leu, Glu252Gly und Deletionen Lys433, Lys434 exprimieren, zu einer Überlebensrate der Mäuse von 100 % und damit zu weniger virulenten Stämmen führen (Bergmann *et al.*, 2003). Pneumokokken, die Einzel-Mutanten der  $\alpha$ -Enolase exprimieren (entweder o.g. Substitutionen oder Deletionen), führen dagegen zu einer Sterberate von 24 %. Im Gegensatz zu den Beobachtungen der SPOT-Membran Analysen, die einen lysinunabhängigen Bindungsmechanismus des internen Epitops erkennen lassen, deuten dagegen die *in vivo* Studien auf einen lysinabhängigen Mechanismus hin.

Die für die Interaktion essentiellen Aminosäuren der Lysinbindungsstellen der Kringle-Domänen des humanen Plasminogens wurden anhand zahlreicher Kristall- und NMR-Strukturen identifiziert. Die Struktur der Lysinbindungsstellen setzt sich aus einem Dipol mit kationischen und anionischen Regionen zusammen, der von hydrophoben Bereichen aromatischer Aminosäuren umgeben ist (Tulinski, 1991). Die Stärke der Bindungsaffinität zwischen den Kringle-Domänen und den Liganden ist abhängig von der Übereinstimmung der Ladung und Polarität der gegenüberliegenden Aminosäuren im Bindungsmotiv. Die Ladungsverteilung des internen Bindungsmotivs der  $\alpha$ -Enolase erfüllt die Voraussetzung für eine Interaktion mit den Lysinbindungsstellen der Kringle-Domänen. Die aromatischen Reste Tyrosin und Phenylalanin flankieren die negativ geladenen Glutamin- und Asparaginsäuren und die positiven Lysine und das Arginin im Zentrum des Bindungsmotivs.

In der vorliegenden Arbeit konnten anhand der oktameren  $\alpha$ -Enolase-Struktur beide Plasminogenbindungsstellen der C-terminalen Barrel-Domäne strukturell beschrieben werden (Abb. 3.15 A). Durch die Anordnung der Monomere im Oktamer kommt zu einer charakteristischen Präsen-

tation der Plasminogenbindungsstellen im Molekül (Abb. 3.15 B/C). Die interne Bindungsstelle (AS 248-256; Epitop 2) ist Teil einer Schlaufe, die exponiert an der Oberfläche aller Monomere liegt. Jeweils vier Schlaufen liegen sowohl auf der Vorderseite als auch auf der Rückseite des Oktamers und sind für Protein-Protein-Interaktionen gut zugänglich (Abb. 3.15 B). Die C-terminalen Lysine liegen dagegen in Furchen zwischen jeweils zwei Dimeren und sind leicht verborgen. Insgesamt stehen 16 Plasminogenbindungsstellen *in vitro* pro Oktamer für die Bindung zur Verfügung. Inwiefern die 16 Bindungsstellen *in vivo* von Plasminogen besetzt werden ist unklar. Bisher ist nicht bekannt, wie die  $\alpha$ -Enolase auf der Zelloberfläche verankert ist, und ob ähnlich, wie im Zellinneren, eine oktamere Form vorliegt. Die oktamere Struktur macht jedoch deutlich, dass optimale Wechselwirkungen mit beiden Plasminogen-Bindungsstellen nur erfolgen können, wenn eine dimere oder monomere Form auf der Oberfläche vorliegen würde.

Interessanterweise ist das zweite Plasminogen-Bindungsepitop der  $\alpha$ -Enolase Teil einer katalytischen Schlaufe (AS 244-265). Zusammen mit zwei anderen Schlaufen (AS 38-45 und 152-159) erfolgt die Schließung des aktiven Zentrums nach Substratbindung während der Gylkolyse im Zellinneren, was zu einer katalysekompetenten Enzymkonformation führt (Kühnel & Luisi, 2001). Da an der Zelloberfläche kein Substrat (PGA) für die  $\alpha$ -Enolase vorhanden ist, liegt die Schlaufe mit dem zweiten Plasminogenbindungsepitop wahrscheinlich immer in der offenen, für Plasminogen leicht zugänglichen Konformation vor. Die katalytische Schlaufe und gleichzeitig ein Plasminogen-Bindungsepitop, weist zusätzlich die größten strukturellen Unterschiede zwischen prokaryontischen und eukaryontischen  $\alpha$ -Enolasen auf (Kühnel & Luisi, 2001). Die Schlaufe ist bei allen prokaryontischen  $\alpha$ -Enolasen im Schnitt um vier Aminosäuren kürzer. Diese Beobachtung konnte anhand des Strukturvergleichs in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 3.12).

Der Homologievergleich der Plasminogen-Bindungsstellen der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* mit äquivalenten Bereichen anderer Plasminogen-bindender  $\alpha$ -Enolasen zeigt, dass die Positionen der aromatischen Aminosäuren des internen Motivs hoch konserviert sind (Abb. 4.3). Die Aminosäuren dazwischen können in der gleichen Abfolge nur bei Streptokokken-Arten nachgewiesen werden. Die C-terminalen Lysine sind jedoch auch in anderen Plasminogen-bindenden  $\alpha$ -Enolasen vorhanden. Über die Plasminogen-Bindungsstellen der  $\alpha$ -Enolasen aus *Onchocerca volvulus* (Jodard *et al.*, 2003) und *Aeromonas hydrophila* (Sha *et al.*, 2003) ist bisher nichts bekannt. Dies weist auf eine wichtige Bedeutung des internen Bindungsmotivs für Plasminogenbindung der Streptokokken hin.

<u>Organismus</u>	<u>Internes Motiv</u>	<u>C-Terminus</u>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	FYDKERKV-YDY	KK
<i>Streptococcus pyogenes</i>	FYDKERKV-YDY	KK
Ratte alpha	FYRA-GK--YDL	AK
Human alpha	FFRS-GK--YDL	AK
Human beta	FYRN-GK--YDL	AK
<i>Onchocerca volvulus</i>	-YSKADKLYDL	QA
<i>Aeromonas hydrophila</i>	FYDAE-KKEYNL	QA

Abb. 4.3: Homologievergleich des internen Bindungsmotivs und der C-terminalen Lysine der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* mit anderen bekannten Plasminogen-bindenden  $\alpha$ -Enolasen

#### 4.1.4 Lysinbindungsstellen und Mechanismus der Bindung von humanem Plasminogen

Die Plasminogen-Aktivierung wird über die Lysinbindungsstellen innerhalb der fünf Kringle-Domänen induziert und reguliert. Je nach Ligand kann Plasminogen drei unterschiedliche Konformationen annehmen (Knudsen *et al.*, 1986; Plow *et al.*, 1986; Thorsen *et al.*, 1975). Die Konformationsmodelle beruhen auf Röntgen-Kleinwinkelstreuungsdaten, analytischen Gelfiltrationen sowie dynamischer Lichtstreuungen in An- bzw. Abwesenheit von Lysinanaloga, welche ebenfalls zur Charakterisierung einzelner Kringle-Domänen dienen. Die synthetischen Lysinanaloga Aminoheptansäure (6-AHA) und Hexylamin (AH) imitieren C-terminale Lysine bzw. Lysine, die in einer Polypeptidkette vorliegen (interne Lysine). Das Derivat Benzamidin ist dagegen vergleichbar mit aromatischen Aminosäuren. Die Bindungsaffinitäten der einzelnen Kringle für unterschiedliche Derivate sind in der folgenden Tabelle 4.1 zusammengefasst:

Tabelle 4.1: Bindungseigenschaften der Kringle des humanen Plasminogen zu synthetischen Lysinanaloga und Benzamidin

Kringle	C-term. Lysine (6-AHA)	internes Lysine (AH)	aromatische AS (Benzamidin)	Referenz
K1	stark	stark	/	Lerch <i>et al.</i> , 1980 ; Matsuka <i>et al.</i> , 1990
K2	schwach	/	/	Marti <i>et al.</i> , 1994
K4	schwächer als K1	/	/	Petros <i>et al.</i> , 1989 ; Rejante <i>et al.</i> , 1991
K5	schwächer als K4	sehr schwach	stark	Chang <i>et al.</i> , 1998 ; Marschall <i>et al.</i> , 1994; Thewes <i>et al.</i> , 1990 ; Varady & Patty, 1981

Alle in Tabelle 4.1 genannten Derivate induzieren unterschiedliche Konformationen des humanen Plasminogens. Benzamidin (Aromat) bindet an K5, aber nicht an K1-4. Die Benzamidin-induzierte Konformation entfaltet das kompakte Plasminogen nur teilweise und ist nicht äquivalent zu der 6-AHA-induzierten Konformation. Um eine vollständig gestreckte Form zu erzeugen, muss eine Zugabe von 6-AHA zu Benzamidin-gebundenem Plasminogen erfolgen. Basierend auf

diesen Daten stellten Marschall *et al.* folgendes Modell für die Plasminogen-Aktivierung auf (1994). Je nach Ligand wird zwischen einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Konformation unterschieden:

**$\alpha$ -Plasminogen:** Die Konformation zeichnet sich durch eine kompakte, spiralförmige Struktur aus und wird durch Interaktionen zwischen dem aminoterminalen Peptid (NTP) und Kringle 5, sowie zwischen Kringle 1-3 und Kringle 4 hervorgerufen. Plasminogen wird geöffnet, wenn ein Ligand mit aromatischen AS an K5 bindet und die intramolekulare Wechselwirkung zwischen K5 und NTP durchbricht. Plasminogen öffnet sich leicht, nimmt die  $\beta$ -Konformation ( **$\beta$ -Plasminogen**) ein und wird nur noch durch intramolekulare Wechselwirkungen zwischen K1-3 und K4 zusammengehalten. Folgt die Bindung eines Liganden mit C-terminalen Lysinen an K1, K2 oder K4 so werden die intramolekularen Wechselwirkungen zwischen K1-3 und K4 gestört und Plasminogen nimmt die vollständig gestreckte  $\gamma$ -Konformation ( **$\gamma$ -Plasminogen**) ein (Marschall *et al.*, 1994; Ponting *et al.*, 1992). Für K3 wurde nie eine Affinität für Lysinanaloga nachgewiesen. K3 besitzt daher eine funktionslose Lysinbindungsstelle (Söhndel *et al.* 1996).

#### 4.1.5 Untersuchungen zur $\alpha$ -Enolase/Plasminogen-Interaktion

Über den Mechanismus der Bindung zwischen der  $\alpha$ -Enolase und Plasminogen ist bisher wenig bekannt. Aus den Ergebnissen bisheriger Interaktionsstudien mittels Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) geht lediglich hervor, dass die Bindung von Plasminogen an die  $\alpha$ -Enolase sehr komplex verläuft. Die Auswertungen veröffentlichter SPR-Messungen erfolgte mittels verschiedener Bindungsmodelle eines Evaluierungsprogrammes (BIAcore). Die Ergebnisse demonstrieren, dass Plasminogen während der Bindung an die  $\alpha$ -Enolase eine Konformationsänderungen erfährt und/oder die Bindung über mehrere unabhängige Bindungsreaktionen erfolgt (Andronicos *et al.*, 2001; Bergmann *et al.*, 2003). Pancholi *et al.* analysierten die Bindung hingegen mit radioaktiv-markiertem Plasminogen nach dem ELISA-Verfahren und beobachteten zwei Bindungsereignisse (1998). Die Ergebnisse der unterschiedlichen Messmethoden sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

**Tabelle 4.2: Interaktion der  $\alpha$ -Enolase mit Plasminogen**

$\alpha$ -Enolase	Messmethode	Bindungskonstanten	Bemerkung	Referenz
Human	SPR	$K_D$ 0.1-4 $\mu$ M	Konformations- änderung	Andronicos <i>et al.</i> , 2001
<i>S. pneumoniae</i>	SPR	$K_{D1}$ 0.55 nM $K_{D2}$ 86.2 nM	Konformations- änderung, mehrere Bindungsreaktionen	Bergmann <i>et al.</i> , 2003
<i>S. pyogenes</i>	radioaktiv	$K_{D1}$ 1.3 nM $K_{D2}$ 7.2 nM	zwei Bindungsreaktionen	Pancholi & Fischetti, 1998

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wechselwirkung der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* mit verschiedenen Plasminogenfragmenten K1-3, K1-4 und K1-5 bzw. vollständigem Plasminogen mit-

tels analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) bzw. Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) untersucht.

Die AUZ ist ein Verfahren, bei der die Interaktion von Proteinen in Lösung beobachtet werden kann. Dies ist ein großer Vorteil bei der Bestimmung biologisch relevanter Assoziationskonstanten. Der Nachteil ist, dass im Gegensatz zur SPR, für die Messung wesentlich größere Mengen Protein erforderlich sind. Die SPR dagegen misst die Wechselwirkung zwischen Proteinen, von denen ein zu untersuchender Bindungspartner (Ligand) an einer Matrix immobilisiert ist, während der andere Interaktionspartner (Analyt) in Lösung über die Matrix geleitet wird. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Immobilisierung der Moleküle an eine Oberfläche zu artifiziellen Bedingungen führt, wodurch die Messergebnisse mehr oder weniger stark verfälscht werden können. Zur detaillierten Auswertung der SPR-Messungen sind darüber hinaus Kenntnisse über den Bindungsmechanismus eine wichtige Voraussetzung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte K1-3 rekombinant in *Pichia pastoris* hergestellt werden und lag damit in ausreichenden Mengen für AUZ-Studien vor. Für das K1-4-His<sub>6</sub>-Fusionsprotein bzw. das K1-5-His<sub>6</sub>-Fusionsprotein konnte weder mittels SDS-PAGE, noch immunologisch im Kulturüberstand bzw. in den löslichen Proteinfractionen der Hefe-Zellen nachgewiesen werden. Für Interaktionsstudien wurden daher kommerzielle Produkte (Calbiochem) verwendet. Die kommerziellen Produkte K1-4 und K1-5 lagen nur in sehr geringen Mengen vor, womit eine Analyse mittels AUZ nicht möglich war. Plasminogen ist von Prof. Preissner (Universität Giessen) zur Verfügung gestellt worden.

Das Ergebnis der AUZ zur Analyse der Interaktion zwischen der  $\alpha$ -Enolase und K1-3 zeigte keine nachweisbare Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen. Daher konnte eine Wechselwirkung mit einer Gleichgewichtskonstante  $K_D < 0.7$  mM ausgeschlossen werden (Tabelle 3.4). Wie erwartet war aus diesen Daten ersichtlich, dass die  $\alpha$ -Enolase unter den getesteten Bedingungen in Lösung als Oktamer vorlag. K1-3 sedimentierte entsprechend dem Molekulargewicht von 30 kDa als einheitliche Bande und wies darüber hinaus keine Oligomere auf.

Im Gegensatz dazu konnte mittels SPR-Messungen eine Wechselwirkung zwischen der  $\alpha$ -Enolase und K1-3 beobachtet werden (Abb. 3.21). Die Bindungskurve zeigte eine sehr schnelle Assoziations- und Dissoziationsphase, charakteristisch für eine kinetisch schnelle Bindung.

Die unterschiedlichen Ergebnisse beider Messmethoden führten zunächst zu der Vermutung, dass es sich um ein artifizielles Bindungsereignis handeln könnte, dass durch die Immobilisierung der  $\alpha$ -Enolase auf der Chipoberfläche erzeugt wurde. Unter Anwendung einer Positiv- bzw. Negativkontrolle konnte jedoch deutlich zwischen einer artifiziiellen und einer spezifischen Bindung unterschieden werden. Während die Negativkontrolle (TTL) zu keinem Anstieg der Resonanzsignale führte, zeigte die Positivkontrolle (Anti-Enolase-Antikörper) einen typischen Bindungsverlauf. Weiterhin wurden nach Abzug der Referenzzelle (keine  $\alpha$ -Enolase immobilisiert) nur spezifische Signale der Messzelle wiedergegeben.

Diese Beobachtung führt letztendlich zu der Vermutung, dass offensichtlich die immobilisierte  $\alpha$ -Enolase nicht der  $\alpha$ -Enolase in Lösung entsprach, und möglicherweise keine oktamere  $\alpha$ -Enolase

auf der Chipoberfläche vorlag. Die Immobilisierung der  $\alpha$ -Enolase erfolgte kovalent an eine carboxymethylierte Dextranmatrix an die Sensorchipoberfläche. Dieser Prozess wurde unter Verwendung chemischer Quervernetzer eingeleitet. Nach Inaktivierung der Reaktion folgte ein intensiver Waschprozess mit 20 mM NaOH bzw. 20 mM HCl. Es wäre also denkbar, dass bei diesem Vorgang die Stabilität des  $\alpha$ -Enolase-Oktamers beeinflusst wurde und kleinere Substrukturen in Form von Dimeren oder Monomeren auf der Chipoberfläche zurückblieben. Unter diesen Voraussetzungen würden folglich beide Plasminogenbindungsstellen der  $\alpha$ -Enolase frei zugänglich vorliegen, wovon eine in der löslichen oktameren Form verborgen ist. Dies würde auch erklären, warum Bergmann *et al.* zwei Gleichgewichtskonstanten bestimmen konnten (2003).

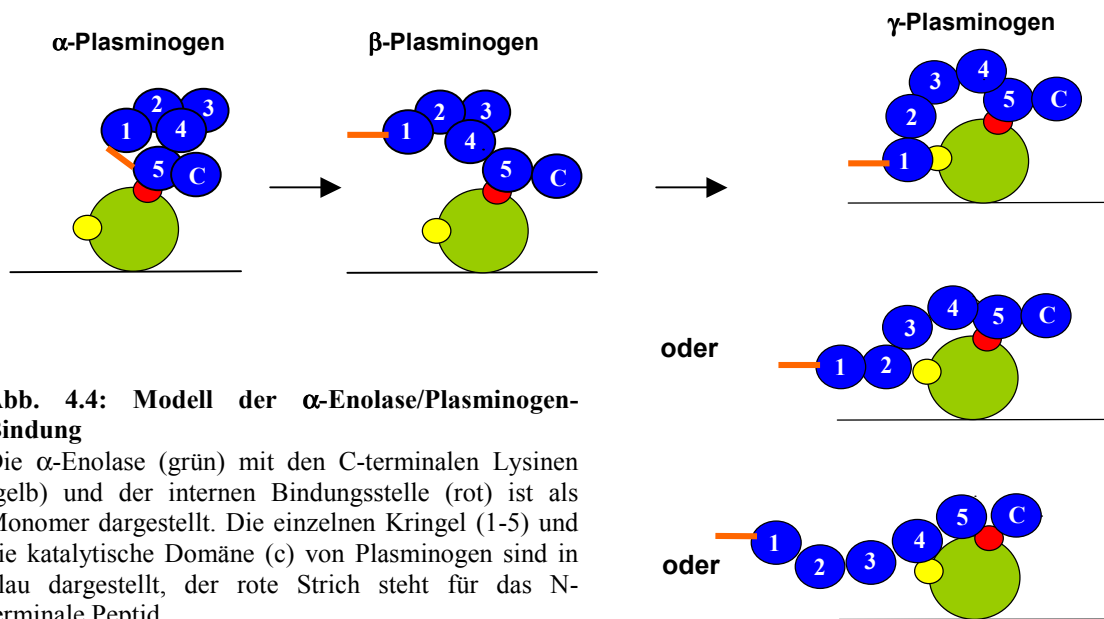
Der Widerspruch in den Ergebnissen der beiden Messmethoden wirft Fragen auf, die zuvor nicht bedacht worden sind. Zur Klärung dieses Widerspruchs könnten weitere Versuche zeigen, welche Faktoren einen Einfluss auf die Stabilität von  $\alpha$ -Enolase-Oktameren haben.

#### 4.1.6 Ein Modell für die $\alpha$ -Enolase/Plasminogen-Bindung

Alle SPR-Messungen mit K1-3, K1-4, K1-5 und Plasminogen wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt (gleicher Chip, gleiche Pufferbedingungen), was einen qualitativen Vergleich der Bindungskurven erlaubte (Abb. 3.22). Der Vergleich zeigte, dass sich die Wechselwirkungen der  $\alpha$ -Enolase mit K1-3, K1-4, K1-5 und Plasminogen wesentlich unterschieden. Während die Interaktion der  $\alpha$ -Enolase mit K1-3 bzw. mit K1-4 einen vergleichbaren Bindungsverlauf zeigte, der charakteristisch für eine kinetisch schnelle Wechselwirkung ist, verlief die Bindung von K1-5 und Plasminogen komplexer und kinetisch wesentlich langsamer. Weiterhin deutete der Vergleich der Bindungskurven von K1-3, K1-4 und K1-5 an, dass K5 maßgeblich an der Bindung beteiligt war und offensichtlich die höchste Affinität für eine der beiden Plasminogenbindungsstellen der  $\alpha$ -Enolase besaß.

Wie unter 4.1.3 erwähnt wurde, wechselwirkt Plasminogen mit  $\alpha$ -Enolase, im Gegensatz zu den C-terminalen Lysinen, scheinbar unter anderem mit den aromatischen und negativ geladenen Aminosäuren der oberflächenlokalisierten Schlaufe. K5 des humanen Plasminogens wechselwirkt als einzige Domäne zusätzlich mit aromatischen Aminosäuren (Tabelle 4.1). Unter diesen Aspekten könnte K5 diejenige Domäne sein, die unter anderem mit den aromatischen Aminosäuren der Schlaufe wechselwirkt. Sollte Plasminogen zuerst mit K5 an die Schlaufe binden, würde entsprechend dem Modell von Marschall *et al.* (1994) eine Konformationsänderung von einem geschlossenen  $\alpha$ - zu einem leicht geöffneten  $\beta$ -Plasminogen erfolgen, wodurch intramolekulare Interaktionen zwischen dem N-terminalen Peptid und K5 im Plasminogenmolekül aufbrechen würden. Nachfolgend könnten K1, K2 oder K4 mit den C-terminalen Lysine der  $\alpha$ -Enolase wechselwirken. K3 besitzt eine funktionslose Lysinbindungsstelle und kann folglich keine lysinabhängige Bindung vermitteln (Söhndel *et al.*, 1996). Die Wechselwirkung der C-terminalen Lysine mit K1, K2 oder K4 würde die Konformationsänderung von  $\beta$ -Plasminogen zum vollständig gestreckten

$\gamma$ -Plasminogen induzieren. Das hypothetische Modell ist in Abbildung 4.4 für das vollständige Plasminogen vereinfacht dargestellt.



**Abb. 4.4: Modell der  $\alpha$ -Enolase/Plasminogen-Bindung**

Die  $\alpha$ -Enolase (grün) mit den C-terminalen Lysinen (gelb) und der internen Bindungsstelle (rot) ist als Monomer dargestellt. Die einzelnen Kringel (1-5) und die katalytische Domäne (c) von Plasminogen sind in blau dargestellt, der rote Strich steht für das N-terminale Peptid.

Broder *et al.* (1989) kamen mit ihren Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen, die dieses Modell stützen. Sie untersuchten die Plasminogenbindung an abgetöteten Streptokokkenzellen (Gruppe A Streptokokken) und zeigten, dass K1-5, im Gegensatz zu K1-3 und K4, die Plasminogenbindung inhibiert. Offensichtlich scheint die Struktur des gesamten K1-5 wichtig zu sein, da einzelne Kringel-Domänen keinen Einfluss auf die Bindung nehmen.

Letztendlich würde die Raumstruktur des Komplexes aus Plasminogen und der  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* die molekularen Wechselwirkungen beschreiben und Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus erlauben. Im Rahmen der Arbeit wurde mit der Kristallisation des Komplexes aus der  $\alpha$ -Enolase und Plasminogen als Basis für die Strukturlösung begonnen. Proteinkristalle des Komplexes konnten jedoch nicht erhalten werden. Versuche im Vorfeld zeigten, dass der Komplex nicht mittels Gelpermeationschromatographie isoliert werden konnte. Plasminogen bindet die  $\alpha$ -Enolase jedoch mit hoher Affinität im nM-Bereich (Bergmann *et al.*, 2003), was eine Voraussetzung für die Isolierung eines Komplexes mittels GPC ist. Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass möglicherweise, ähnlich den Beobachtungen der analytischen Ultrazentrifugation, die oktamere Quartärstruktur der  $\alpha$ -Enolase ein Grund für die ausbleibende Komplexbildung in Lösung sein könnte.

Weitere Experimente mittels analytischer Ultrazentrifugation könnten zeigen, unter welchen Bedingungen die  $\alpha$ -Enolase als Oktamer bzw. Dimer/Monomer vorliegt. Basierend auf diesen Daten könnte nachfolgend untersucht werden, welche der möglichen Quartärstrukturen die Bindung an Plasminogen letztendlich vermittelt. Die Ergebnisse dieser Studien wären eine wichtige Voraussetzung für die Kristallisation des Komplexes.



## 4.2 Die Tubulin-Tyrosin Ligase aus *Sus scrofa* (Schwein)

Die zytosolische Tubulin-Tyrosin Ligase (TTL) ist zusammen mit der Tubulin-Tyrosin Carboxypeptidase (TTCP) für die Tyrosinierung bzw. Detyrosinierung, eine posttranslationale Modifikation des wichtigen Zytoskelettproteins  $\alpha/\beta$ -Tubulin, verantwortlich. Beide Enzyme stellen ein bislang einzigartiges Enzymsystem dar. In assemblierten Mikrotubuli werden die  $\alpha$ -Tubulin-Bausteine durch die spezifische TTCP am C-Terminus detyrosiniert. Nach Dissoziation der Mikrotubuli in  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere fügt die TTL in tRNA-unabhängiger Weise erneut ein Tyrosin an den C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin an. Die Tyrosinierung kommt sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten vor, wodurch ihre Bedeutung unterstrichen wird (Preston *et al.*, 1979; Erck *et al.*, 2000). Um den Prozess der posttranslationalen Modifikation strukturell charakterisieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Kristallisation und Strukturanalyse der TTL aus *Sus scrofa* angestrebt. Der Weg vom Genkonstrukt zu geeigneten Kristallen verlief jedoch weniger geradlinig als erhofft und erforderte unter anderem mehrfach eine Modifizierung des Ausgangskonstrukts. Die Isolierung und Kristallisation, als Basis für die Strukturaufklärung des Komplexes aus der TTL und  $\alpha/\beta$ -Tubulin, war ebenfalls eine Teilaufgabe im Rahmen dieses Projekts.

### 4.2.1 Aktivität und Kristallisation von Cystein-Mutanten

Es konnte bereits im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aggregation der TTL durch unspezifische Disulfidbrückenbildung ein entscheidendes Hindernis für die Bildung von Kristallen ist, da erst nach gezielter Mutagenese der Cysteine 72, 238 und 244 (Mutante TTL11) gegen Serin erste Kristalle erhalten werden konnten (Ehinger, 2000). Das begrenzte Streuvermögen der sehr kleinen Kristalle war jedoch für die Röntgenstrukturanalyse des Enzyms nicht ausreichend. Durch umfangreiche Optimierungsversuche der Kristallisationsbedingung konnten jedoch keine größeren Kristalle erzeugt werden. Immunchemische Untersuchungen dieser kristallisierbaren Cystein-Mutante TTL11 zeigten, dass mindestens ein zusätzliches als zuvor verborgen eingestuftes Cystein, der sieben insgesamt konservierten Cysteine, weiterhin zu einer unkontrollierbaren Oligomerisierung führt und möglicherweise ein Wachstum der kleinen Kristalle verhindert (Ehinger, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der Entfernung der oberflächenexponierten Cysteine 72, 238 und 244 nacheinander weitere Cysteine gegen Serine ausgetauscht (Tabelle 3.7). Alle Cystein-Mutanten wurden auf ihre Aktivität und Kristallisierbarkeit getestet.

Frühere Arbeiten zeigten, dass durch die Modifizierung der TTL mit N-Ethyl-Maleinimid (NEM) das oxidationsempfindliche Enzym ein Cystein enthielt, dass an der Katalyse beteiligt sein könnte (Rüdiger, 1994). Die Ergebnisse der Untersuchungen legten nahe, dass dafür Cys238 bzw. Cys244 in Frage kämen. Die Funktionsanalyse der Mutanten TTL 1-7, in denen je ein Cystein gegen ein Serin ausgetauscht worden war, zeigte, dass keiner der Austausche allein einen nen-

nenswertem Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzyms hat (Ehinger, 2000). Die Funktionsanalyse der in dieser Arbeit neu generierten Cystein-Mutanten, die multiple Cystein-Austausche gegen Serin enthielten (Kap.3.2.3) zeigte, dass der gleichzeitige Austausch der Cysteine 72, 91, 238, 244 und 347 keinen erkennbaren Einfluss auf die katalytische Aktivität der TTL hatte. Die zusätzliche Substitution von Cystein 294 bzw. 338 gegen Serin, resultierte hingegen in einem Aktivitätsverlust von 24 % bzw. 39 %. Der Austausch aller Cysteine gegen Serin (Cystein-freie Mutante, TTL21), führte zu einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms. Zusammen scheinen Cystein 294 und 338 somit maßgeblich für die Aktivität der TTL zu sein.

Die Substitution der Cysteine 72, 91, 238, 244 und 347 gegen die kleinere, weniger hydrophobe Aminosäure Serin verursachte scheinbar nur geringe strukturelle Änderungen, so dass die Bindung und Umsetzung des Substrates durch das Enzym weiterhin möglich war, dokumentiert durch den geringen Aktivitätsverlust von 9 %. Während der Verlust von Cys294 oder Cys338 noch teilweise durch das verbleibende Cystein kompensiert werden konnte (24 % bzw. 39 % geringere Aktivität), führte die Substitution von Cys294 und Cys338 zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust.

Der beobachtete Effekt könnte entweder strukturelle Gründe haben oder durch eine mittelbare Beteiligung der Cysteine an der Reaktion begründet werden. Beide Cysteine sind daher möglicherweise in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert. Im ersten Fall könnten die Cysteine an intramolekularen Kontakten beteiligt sein, die das aktive Zentrum stabilisieren. Eine Substitution könnte zu strukturellen Änderungen führen, wodurch die Stabilität des aktiven Zentrums ungünstig beeinflusst wird. Im zweiten Fall wäre es möglich, dass die Cysteine sich in räumlicher Nähe katalytisch aktiver Aminosäuren befinden und diese durch ihre spezifische nukleophile Reaktivität beeinflussen. Der Austausch des Cysteins gegen Serin, wodurch anstelle des Schwefels ein Sauerstoff eingeführt wird, könnte somit einen aktivitätsmindernden Einfluss auf die katalytisch wichtigen Aminosäuren haben.

Die Cystein-Mutanten TTL19 (Cys72, 91, 238, 244, 294, 347) und TTL21 (Cystein-freie Mutante) kristallisierten beide unter der gleichen Bedingung und wiesen einen neuen Kristallhabitus in Form verwachsener Plättchen auf.

Die Auflösung der Kristalle konnte mit der neuen Mutante TTL19 mit einer maximalen Auflösung von 3.3 Å erheblich verbessert werden. Die Auswertung des Röntgen-Datensatzes erlaubte die Bestimmung der monoklinen Raumgruppe  $P2_1$  ( $a = 47.28$ ,  $b = 195.33$ ,  $c = 91.92$  Å,  $\beta = 96.03^\circ$ ). Anhand der Gitterkonstanten und geometrischen Beziehungen wurde zunächst eine monokline Kristallsymmetrie mit vier Molekülen pro asymmetrische Einheit ( $V_M = 2.4$  Å<sup>3</sup>/Dalton; Solvensgehalt 49 %) bestimmt.

Die Kristallpackungsanalyse deutete neben der monoklinen Raumgruppe eine pseudo-orthorhombische und darüber hinaus eine weniger ausgeprägte pseudo-tetragonale Symmetrie an. Die Symmetrieachsen der letzten beiden genannten Kristallsysteme waren jedoch, wie dies bei Proteinkristallen häufiger der Fall ist, nicht-kristallographisch. Morphologisch ähnelten die Kris-

talle allerdings eher Stapel von Plättchen, während die nicht-kristallographischen Achsen die normalen Kristallflächen bildeten. Wird solch ein Kristall senkrecht zur Röntgenstrahlung platziert, erscheinen Reflexe unterschiedlich und vereinigen sich zu verschmierten Streifen. Die Reflexe waren daher nicht eindeutig zu unterscheiden, wodurch eine Strukturlösung auf Basis dieser Daten nicht möglich war. Optimierungsversuche der Kristallisationsbedingungen und verschiedene Kristallisationsmethoden resultierten stets in der gleichen Kristallmorphologie in Form von verwachsenen, dünnen Plättchen.

An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass die Aggregation der TTL durch unspezifische Disulfidbrückenbildung ein Hauptfaktor ist, der einen signifikanten Einfluss auf die Kristallbildung der TTL hat. Mit der Cystein-Mutante TTL19 konnte die Aggregation der TTL soweit verhindert werden, dass Kristalle mit einer deutlich verbesserten Auflösung erzeugt werden konnten. Die Funktionsanalyse der multiplen Cystein-Mutanten zeigte, dass die Cysteine 294 und 338 scheinbar an der Aktivität der TTL beteiligt sind. Die kristallisierbaren Mutanten TTL19 und TTL21 stellen somit eine vermindert aktive bzw. eine inaktive Form des Enzyms dar.

#### 4.2.2 Proteolytischer Abbau der TTL

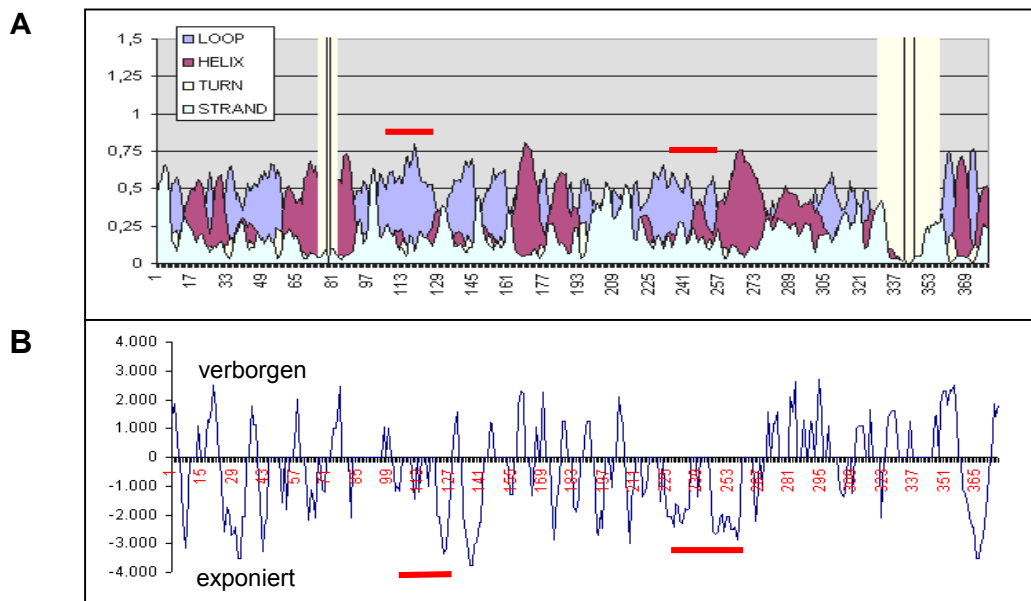
Der proteolytische Abbau der TTL ist möglicherweise ein weiterer Grund für die Schwierigkeiten Kristalle der TTL zu erhalten. Für die Röntgenstrukturanalyse ist neben der Größe und dem Streuvermögen ein hochgeordneter Kristall von geringer Mosaizität ausschlaggebend, welche in Form der erhaltenen TTL19-Kristalle nicht in allen drei Dimensionen gegeben war. Die Bildung hochgeordneter, dreidimensionaler Kristalle setzt eine monodisperse Proteinlösung aus vollständigen, stabilen Proteinmolekülen voraus. Mit der Mutante TTL19 wurde die Voraussetzung einer monodispersen Lösung zunächst erfüllt, die zu einer Bildung von Kristallen mit einer deutlich höheren Auflösung führte.

Das Beugungsmuster der TTL19-Kristalle zeigte in eine Richtung jedoch deutlich verschmierte, unsaubere Reflexe, ein Anzeichen einer uneinheitlichen Kristallpackung. Dies unterstützte die Beobachtung, dass Kristalle entweder als besonders dünne Plättchen vorkamen oder als Stapel solcher Plättchen zu erkennen waren. TTL-Moleküle ergaben also offensichtlich zweidimensionale Schichten, wobei günstige Packungskontakte in der dritten Dimension fehlten.

Ursache für die uneinheitliche Kristallpackung könnte der proteolytische Abbau der TTL sein. Homogene TTL-Präparationen wiesen stets ein charakteristisches Abbaumuster auf, das sich auf zwei Regionen im Protein konzentrierte (Abb.3.27). Allgemein gilt jedoch, dass die Fragmente auch im gespaltenen Zustand eine strukturelle Einheit bilden und nicht durch native Trennverfahren isoliert werden können (Wehland & Weber, 1987a; diese Arbeit). Vermutlich werden daher lediglich flexible, leicht zugängliche Schlaufen gespalten (*nicking*), ohne dass inhärent vorliegende Domänen voneinander getrennt werden. So scheinen zwei verschiedene Bereiche der TTL demnach „Sollbruchstellen“ zu enthalten, deren Spaltung zwar nicht die Gesamtstruktur des Proteins beeinträchtigen, jedoch zu einer Inhomogenität der Probe und möglicherweise zu einer erhöhten Flexibilität der instabilen Proteinbereiche führen. Möglicherweise liegt hier auch der

Grund für die geringe Löslichkeit der TTL, dokumentiert durch die relativ schnelle Präzipitation während der Lagerung und bei Kristallisationsversuchen. Alle bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass diese Regionen sehr flexibel, leicht zugänglich für Proteasen und schwer zu stabilisieren sind.

Sekundärstrukturvorhersagen der TTL ergaben, dass die bereits erwähnten labilen Bereiche der TTL wahrscheinlich Schleifen umfassen, die möglicherweise auf der Oberfläche exponiert sind (Abb.4.5 A und B).



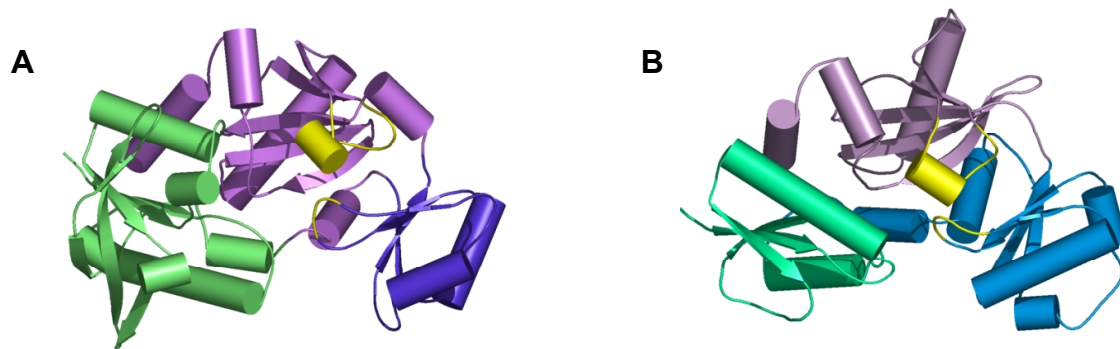
**Abb. 4.5: Sekundärstrukturvorhersage und Hydrophobizitätsanalyse der TTL**

**A)** Die Sekundärstrukturvorhersage wurde über die Datenbank SWISS-PROT mit dem PSA Server auf Basis der Aminosäuresequenz berechnet. Die Werte für jede AS geben die höchste Wahrscheinlichkeit für eine der möglichen Sekundärstrukturelemente an. **B)** Der hydropathische Index für jede AS wurde ebenfalls über die Datenbank SWISS-PROT mit dem Programm PROTSKALE nach Kyte & Doolittle (1982) berechnet. Die roten Balken kennzeichnen jeweils die instabilen Bereiche der TTL.

Strukturbasierte Sequenzvergleiche, die eine schwache Sequenzhomologie für ATP-Bindungsstellen erkennen ließen, ordneten die TTL in die Familie der ADP-bildenden Synthetasen ein (Galperin & Koonin, 1997). Folglich wurde eine ähnliche Struktur zu schon bekannten Synthetase-Strukturen postuliert (Galperin & Koonin, 1997; Dideberg & Bertrand, 1998). Dieser Familie gehören neben der Glutathion-Synthetase (GSHase; Yamagushi *et al.*, 1993), auch die D-Alanin-D-Alanin Ligase (DDLigase; Fan *et al.*, 1994), die Biotin-Carboxylase (BC; Artymiuk *et al.*, 1996), die Succinyl-CoA-Synthetase (SCS; Wolodko *et al.*, 1994) und das Synapsin I (SynC; Esser *et al.*, 1998) an.

Kristallstrukturen ADP-bildender Synthetasen zeigen trotz geringer Sequenzhomologie signifikante strukturelle Ähnlichkeiten (Esser *et al.*, 1998). Mitglieder dieser Familie besitzen alle eine gemeinsame Faltung, den sogenannten „ATP-grasp-fold“. Hier wird ATP in einer Tasche gebunden, die aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen und einer sie verbindenden kurzen Glycinreichen Schleife (P-Loop) gebildet wird (Hibi *et al.*, 1996). Für die TTL wurde der Glycin-reiche

Bereich zwischen AS<sub>146</sub>VWIAKSSAGAKGEG<sub>159</sub> als ATP-Bindestelle postuliert, wobei die Aminosäuren K150 und G157 maßgeblich an der ATP-Bindung beteiligt sein könnten (Galperin & Koonin, 1997). Aktivitätstest von Substitutions-Mutanten (K150A, G157A) zeigen übereinstimmend einen vollständigen Verlust der Enzymaktivität und stützen somit das Modell (Papp, 2000). Neben der typischen „ATP-grasp“-Faltung ist auch die Domänenstruktur dieser Enzyme ähnlich. So bestehen Monomere der GSHase, DD-Ligase und Synapsin I aus einer N-terminalen, einer zentralen und einer C-terminalen Domäne (Beispiele in Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: Struktur der Glutathion-Synthetase (A) und DD-Ligase (B)**

Modelle der Monomere der GSHase (A) und DD-Ligase (B). Die Domänen sind farblich unterteilt: N-terminale Domäne (grün), zentrale Domäne (blau) und C-terminale Domäne (lila).  $\beta$ -Stränge sind als Pfeile,  $\alpha$ -Helices als Zylinder dargestellt. Gelbe Bereiche markieren die Schleifen, die an der ATP-Bindung (kurzer P-Loop) und der Schließung des aktiven Zentrums (langer Loop mit Helix) beteiligt sind (modifiziert nach Matsuda *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1994; PDB entry code 2GLT und 1IOV).

Für die Glutathion-Synthetase und andere Proteine dieser Familie sind ähnliche flexible, proteaseempfindliche Schleifen beschrieben. Die Synthetase-Strukturen enthalten eine lange Schleife mit einer dazwischenliegenden  $\alpha$ -Helix in der zentralen Domäne. Die Schleife umfasst 15-17 Aminosäuren, ist sehr flexibel und wird leicht von Proteasen angegriffen. Die Schleife dient als „Deckel“ und schützt das aktive Zentrum nach der Bindung des Substrats (Abb.4.6, gelbe Schleife mit Helix) (Matsuda *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1994; Esser *et al.*, 1998).

Die Sekundärstrukturvorhersage der TTL (Abb. 4.7) zeigt, dass die Reste 232-252 der proteaseempfindlichen Region mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Schleife mit dazwischen liegender  $\alpha$ -Helix umfassen. Möglicherweise handelt es sich bei dieser instabilen Region, die 22 Reste umfasst, um eine ähnliche Schleife mit Deckelfunktion.

#### 4.2.3 Stabilisierung der Mutante TTL19 in Anwesenheit von Fab-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers ID3

Obgleich mit der Cystein-Mutante TTL19 Kristalle mit einer wesentlich höheren Auflösung erhalten werden konnten, scheint die Spaltung der TTL jedoch einen Einfluss auf die Kristallpackung zu haben. Weiterhin scheint die Stabilität der TTL maßgeblich mit der Spaltung zusammenzuhängen (Abb.3.26). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Methode etabliert werden, mit der die Stabilität der TTL maßgeblich erhöht werden kann. Die TTL war im Komplex mit Fab-

Fragmenten des monoklonalen Antikörpers ID3 über mehrere Wochen lang sichtbar stabiler. Im Vergleich zur unkomplexierten TTL wurde bei der Lagerung keine Präzipitatbildung nachgewiesen.

Antikörper oder Antikörperfragmente werden häufig zur Kokristallisation hydrophober Membranproteine verwendet. Die Fähigkeit hydrophober Membranproteine ausreichende Kristallkontakte auszubilden, wird in Anwesenheit eines hydrophilen Antikörpers wesentlich erhöht, da zusätzlich polare Oberflächen eingeführt werden. Hierdurch kann es zur verbesserten Packung der Proteinmoleküle und somit zu einer Kristallbildung kommen. Zusätzlich kann ein Ligand, wie z.B. Antikörperfragmente, zu einer definierten Konformation eines Proteins führen und dieses fixieren (Hunte & Michel, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit bot sich daher die Kokristallisation der TTL mit Fab-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers ID3 an. Der Antikörper ID3 erkennt das lineare Epitop, das die Aminosäuren 245-260 und damit auch sämtliche identifizierte Spaltstellen, unter anderem die der V8-Protease, enthält. Der Antikörper eignet sich daher besonders gut, um die labile Region der TTL einheitlich zu stabilisieren und inhomogene, flexible Bereiche abzudecken. Zusätzlich blockiert der Antikörper ID3 das aktive Zentrum der TTL (Wehland & Weber, 1987). Die Struktur der TTL im Komplex mit diesem Antikörper würde darüber hinaus entscheidende Informationen über das aktive Zentrum der TTL liefern.

Die Untersuchung der Kristallisationsansätze zeigte, dass der Komplex unter verschiedensten Bedingungen langsamer präzipitierte als nicht komplexierte TTL. Die Löslichkeit der TTL im Komplex mit den Fab-Fragmenten des Antikörpers ID3 konnte somit signifikant erhöht werden und erfordert daher unbedingt weitere Kristallisationsversuche. Eine umfangreiche Analyse der Kristallisationseigenschaften des Komplexes war aus Mangel ausreichender Antikörpermengen nicht mehr möglich. Die Produktion der Antikörper ist ein sehr zeitaufwendiger Prozess und konnte aus diesem Grund im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

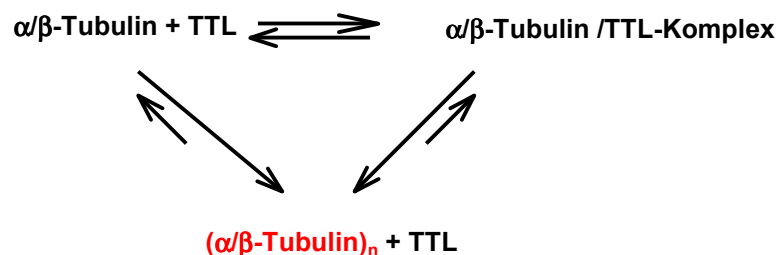
Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass ein vielversprechendes System etabliert werden konnte, dass die Kristallisation der TTL in Zukunft vereinfachen wird, da Störfaktoren, wie die Spaltung der TTL, damit unterdrückt werden können. Es wäre durchaus denkbar, dass eine Koexpression beider Proteine die Spaltung der TTL in *E.coli*-Zellen schon von vornherein unterbindet.

#### **4.2.4 Kokristallisationsversuche der Mutante TTL19 mit C-terminalen Peptiden von $\alpha$ -Tubulin und detyrosiniertem $\alpha/\beta$ -Tubulin**

C-Terminale Peptide von  $\alpha$ -Tubulin mit einer Länge von 5 Aminosäuren können bereits tyrosiniert werden (Rüdiger *et al.*, 1994). Wesentlich bessere Substrate sind jedoch Peptide mit mindestens 13 C-terminalen Aminosäuren des  $\alpha$ -Tubulins. Im Vergleich zu detyrosiniertem  $\alpha/\beta$ -Tubulin erweisen sich die Peptide jedoch als wesentlich schwächere Substrate (Rüdiger *et al.*, 1994). Eine mögliche Erklärung für diese höhere Selektivität konnte aus *Crosslinking*-Experimenten gewon-

nen werden. Die Versuche zeigten, dass die TTL über ihre N-terminale Domäne auch mit  $\beta$ -Tubulin spezifisch interagiert (Wehland & Weber, 1987). Die Kristallisationsversuche der TTL zusammen mit synthetischen Peptiden führten zu keiner Kristallbildung. Eine mögliche Erklärung wäre die Abwesenheit von  $\beta$ -Tubulin, welches die Bindungsaffinität signifikant beeinflusst (Rüdiger *et al.*, 1994). Für die Bildung des TTL- $\alpha/\beta$ -Tubulin-Komplexes wird der divergente C-Terminus des  $\alpha$ -Tubulins (Substrat der enzymatischen Reaktion) zunächst nicht benötigt (Wehland & Weber, 1987a, diese Arbeit). Folglich wäre es denkbar, dass die Bindung an  $\beta$ -Tubulin eine Konformationsänderung im TTL-Molekül verursacht, die erst dann zu einer stabilen Bindung des C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin führt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen Komplexkristalle aus der TTL und  $\alpha/\beta$ -Tubulin erhalten werden. Die GPC-Daten zeigten eine signifikante Verschiebung des TTL/ $\alpha/\beta$ -Tubulin-Gleichgewichts in Richtung aggregiertes  $\alpha/\beta$ -Tubulin (Abb.4.7).



**Abb. 4.7: Gleichgewichtsverschiebung des  $\alpha/\beta$ -Tubulin/TTL-Komplex nach der Isolierung des Komplexes.**

Nach der Komplexisolierung findet eine signifikante Verschiebung des TTL/ $\alpha/\beta$ -Tubulin-Komplex-Gleichgewichtes in Richtung aggregiertes  $\alpha/\beta$ -Tubulin statt, der zu einer Inhomogenität der Proteinlösung führt.

Kokristallisationsexperimente jedoch, die eine homogene Verteilung der zu kristallisierenden Interaktionspartner voraussetzen, sind auf Grund dieser Inhomogenität nur bedingt durchführbar. Ausschlaggebend bleibt letztendlich der Polymerisationsgrad von  $\alpha/\beta$ -Tubulin.

Bis heute konnten noch keine 3D-Kristalle löslicher  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere erhalten werden. Das bestehende Strukturmodell eines  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimers wurde über 2D-Kristalle Zink-induzierter Taxol-stabilisierter Mikrotubuli bei einer maximalen Auflösung von 3.5 Å erhalten (Nogales *et al.*, 1998). Andere Kristallisationsexperimente zeigten, dass zunächst lösliche  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere im Laufe des Kristallisationsprozesses entweder ringförmige Strukturen oder kleinere Aggregate ausbildeten (Schönbrunn *et al.*, 1999; Loberts & Correia, 1991). Bis heute konnte noch keine Methode etabliert werden, die lösliche  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimere vor der Polymerisation schützt und somit deren Kristallisation ermöglicht.

Weiterhin wäre denkbar, dass wichtige Komponenten fehlen, welche die Affinität der TTL für  $\alpha/\beta$ -Tubulin erhöhen. Möglicherweise könnte das Gleichgewicht des gebildeten Komplexes in Anwesenheit funktionell wichtiger Kofaktoren aufrechterhalten werden, ohne dass  $\alpha/\beta$ -Tubulin aggregiert. Für die enzymatische Reaktion werden neben dem Heterodimer  $\alpha/\beta$ -Tubulin auch L-

Tyrosin, ATP und  $Mg^{2+}$ -Ionen benötigt. In Anwesenheit aller Substrate würde die enzymatische Umsetzung von  $\alpha/\beta$ -Tubulin erfolgen. Ein über längere Zeit stabiler Komplex mit gebundenen Substraten wäre in Anwesenheit eines Inhibitors denkbar. Für erste Kokristallisationsversuche wurde unter anderem AMP-PNP verwendet. AMP-PNP ist ein nicht hydrolysierbares ATP-Derivat und führt zu einer vollständigen Inhibierung der TTL (Papp, 2000).

In ersten Versuchen wurde die Kristallisationseigenschaft des Komplexes unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Kristallisation erfolgte zum einen ohne Zugabe von Kofaktoren. Komplexkristalle wurden, wie erwartet, nicht erhalten. Zum anderen erfolgte eine Zugabe verschiedener Kofaktoren sofort nach der Komplexisolierung, Komplexkristalle wurden jedoch auch hier nicht erhalten. Anhand der Kristallisationsexperimente konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Komplex in Anwesenheit von Kofaktoren bestehen blieb bzw.  $\alpha/\beta$ -Tubulin nicht aggregierte. Weitere GPC-Analysen unter Verwendung verschiedener ATP-Derivate oder Substratanaloga von L-Tyrosin würden zeigen, ob die Aggregation von  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit von Kofaktoren bzw. Substraten unterdrückt werden kann.

Darüber hinaus kann die Inhomogenität der Tubulin-Präparation die Kristallisation erschweren. Für höhere Eukaryonten sind bisher sechs funktionell verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulingene bekannt, deren Expression je nach Entwicklungsgrad in verschiedenen Geweben erfolgt, wobei Tubuline verschiedener Typen gleichzeitig in einer Zelle exprimiert werden (Cleveland & Sullivan, 1985; Little & Seehaus, 1988; Luduena, 1993). Die höchste Variabilität liegt innerhalb der letzten C-terminalen 15 Aminosäuren von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, der sogenannten isotypen-definierenden Konsensussequenz (Littauer *et al.*, 1986; Luduena, 1998). Die funktionelle Signifikanz der Divergenz ist bisher nicht verstanden. Möglicherweise beeinflussen verschiedene Tubulin-Isotypen und deren Modifikationen die Struktur und Funktion der Mikrotubuli (McKean *et al.*, 2001). Die vielfältigen Eigenschaften der MT sind dabei ebenso auf zahlreiche posttranslationale Modifikationen zurückzuführen (MacRae, 1997; Westermann & Weber, 2003). Die Modifikationen erlauben besonders effiziente Modulationen der MT-Funktion, da sie rasch und hochspezifisch erfolgen. Neben Phosphorylierungen, die über das gesamte  $\alpha/\beta$ -Tubulin verteilt sind, erfolgen die meisten Modifikationen speziell am C-Terminus der MT. Hier kommt es neben der Tyrosinierung zusätzlich zu Polyglutamylierungen und Polyglycierungen der stark sauren C-terminalen Enden von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (MacRae, 1997; Westermann & Weber, 2003). Bei der Präparation von polygenem neuronalem  $\alpha/\beta$ -Tubulin können posttranslationale Modifikationen nicht unterdrückt werden, so dass das gereinigte  $\alpha/\beta$ -Tubulin stets heterogener Natur ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten strukturellen und funktionellen Analysen des Komplexes aus TTL und  $\alpha/\beta$ -Tubulin zeigen, dass die Kokristallisation durch die Inhomogenität der Proteinlösung erschwert wird. Die Ergebnisse liefern jedoch neue Ansatzpunkte für weitere Versuche.



## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Die $\alpha$ -Enolase aus *Streptococcus pneumoniae*

In *S. pneumoniae* ist die  $\alpha$ -Enolase ein intrazelluläres glykolytisches Enzym, das zudem extrazellulär als Virulenzfaktor auftritt, der spezifisch mit humanem Plasminogen wechselwirkt. Die Plasminogen-Bindung durch die  $\alpha$ -Enolase der Pneumokokken führt zu einer Konzentrierung potentieller proteolytischer Aktivität an der Zelloberfläche, wodurch die Migration des humanpathogenen Bakteriums in tiefere Gewebeschichten des Wirtes eingeleitet wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Kristallstruktur der  $\alpha$ -Enolase durch molekularen Ersatz gelöst und bei einer Auflösung von 2.0 Å beschrieben werden. Im Gegensatz zu dimeren eukaryontischen und einigen prokaryontischen  $\alpha$ -Enolasen besitzt die  $\alpha$ -Enolase aus *S. pneumoniae* eine oktamere Quartärstruktur.

Der Strukturvergleich mit  $\alpha$ -Enolasen, die kein Plasminogen binden, zeigte, dass die Tertiärstrukturen aller  $\alpha$ -Enolasen nahezu identisch sind. Strukturbasierte Sequenzvergleiche dimerer und oktamerer  $\alpha$ -Enolasen zeigten, dass die oktamere  $\alpha$ -Enolase eine verkürzte  $\alpha$ -Helix 4 besitzt, die am Ende durch zwei aufeinanderfolgende Glycine geprägt ist. Die Insertion von 3-5 Aminosäuren am Ende dieser  $\alpha$ -Helix ist der Grund für die ausbleibende Oktamerisierung der dimeren  $\alpha$ -Enolasen.

Zudem wurden die auf Aminosäuresequenzebene bekannten Plasminogen-Bindungsstellen in der Struktur des Oktamers lokalisiert. Hier konnte gezeigt werden, dass eines der beiden Bindungs epitope im Oktamer in einer Furche zwischen zwei Dimeren verborgen ist, während das zweite Epitop Teil einer oberflächenexponierten Schlaufe ist, die im Oktamer frei zugänglich für Plasminogen vorliegt.

Bindungsstudien zur Interaktion der  $\alpha$ -Enolase mit den verschiedenen Plasminogenteilfragmenten Kringle 1-3, 1-4 und 1-5 zeigten, dass das Teilfragment Kringle1-5 des humanen Plasminogens die höchste Affinität für die  $\alpha$ -Enolase besitzt. Aus diesen Ergebnissen konnte unter Berücksichtigung veröffentlichter Daten ein Modell für die Plasminogenbindung postuliert werden. Nach diesem Bindungsmodell würde die fünfte Kringle-Domäne des humanen Plasminogens mit einer oberflächenexponierten Schlaufe der  $\alpha$ -Enolase wechselwirken und so eine Öffnung des kompakten Plasminogens induzieren. Nachfolgend würden entweder Kringle 1, 2 oder 4 mit dem zweiten Bindungs epitop wechselwirken, was vermutlich zu einer vollständigen, aktivierbaren Konformation des humanen Plasminogens führt.

## 5.2 Die Tubulin-Tyrosin Ligase aus *Sus scrofa*

Die Tubulin-Tyrosin Ligase ist eine Peptidligase, die in tRNA-unabhängiger Weise ein Tyrosin an den C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin anfügt. Das Enzym bildet dabei einen Komplex mit dem löslichen  $\alpha/\beta$ -Tubulin.

In Anwesenheit von Sauerstoff aggregiert die TTL über unspezifische Disulfidbrückenbildung oberflächenexponierter Cysteine. Durch den Austausch der Cysteine 71, 238 und 244 gegen Serin (Mutante TTL11) gelang es erstmals das Protein zu kristallisieren (Ehinger, 2000). Die Kristalle konnten röntgenographisch bis zu einer maximalen Auflösung von 8.0 Å vermessen werden. In der vorliegenden Arbeit gelang es durch zusätzliche Substitutionen der Cysteine 91, 294 und 347 (Mutante TTL19) Kristalle mit einem wesentlich höheren Beugungsvermögen von 3.3 Å zu erzeugen. Es konnte die monokline Raumgruppe  $P2_1$  mit einer spezifischen Kristalldichte  $V_M = 2.43 \text{ Å}^3/\text{Da}$  ermittelt werden. Kristalldefekte erlaubten es jedoch nicht, diese für die Röntgenstrukturanalyse zu verwenden.

Mit Hilfe von Aktivitätsuntersuchungen von multiplen Cystein-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Cysteine 294 und 338 die Aktivität des Enzyms herabsetzen und daher möglicherweise in der Nähe des aktiven Zentrums liegen.

Die TTL ist ein proteaseempfindliches Enzym mit einer geringen Löslichkeit. Die Spaltung der TTL führt zu einer Inhomogenität, wodurch die Kristallisation des Proteins erheblich beeinträchtigt wird. Durch N-terminale Sequenzanalysen wurden zwei äußerst labile, vermutlich flexible Schleifen der TTL identifiziert, die einen erheblichen Einfluss auf die Löslichkeit des Enzyms zu haben scheinen. Diese Interpretation wurde durch Sekundärstrukturvorhersagen unterstützt.

Komplexierungsstudien der TTL mit Fab-Fragmenten des monoklonalen Antikörpers ID3 zeigten, dass mit dieser Methode die Löslichkeit des Enzyms wesentlich erhöht werden konnte. Der Antikörper bindet zufälligerweise einen der proteaseempfindlichen Bereiche und eignet sich daher besonders zur Herstellung einer homogenen Proteinprobe, die auch zur Kristallisation besonders geeignet sein sollte. Aus Kristallisationsversuchen konnten bisher noch keine Kristalle erhalten werden.

Weiterhin wurde im Rahmen der Arbeit mit der Isolierung und Kristallisation des Komplexes zwischen der TTL und  $\alpha/\beta$ -Tubulin als Basis für die Strukturaufklärung begonnen. Der Komplex konnte mittels Gelpermeationschromatographie isoliert werden, erwies sich jedoch nicht als stabil. Die Ergebnisse zeigten, dass  $\alpha/\beta$ -Tubulin in Anwesenheit der TTL trotz Zugabe eines Polymerisationshemmers aggregierte. Eine Kokristallisation war auf Grund der Inhomogenität der Proteinlösung nicht möglich.

## 6.Literaturverzeichnis

- Alfa, C.E. & Hyams, J.S.** (1991). Microtubules in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* contain only the tyrosinated form of alpha-tubulin. *Cell Motil. Cytoskeleton* **18**, 86-93.
- Amos, L. A. & Baker, T. S.** (1979). The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature* **279**, 607-612.
- Andronicos, N.M., Baker, M.S. Lackmann, R.M.** (2000). Deconstructing the interaction of glu-plasminogen with its receptor  $\alpha$ -enolase. *Fibrinolysis & Proteolysis* **14**, 327-336.
- Angiolella, L., Faccin, M. Stringaro, A., Maras, B. Simonetti, N. Cassone, A.** (1996). Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J. Infect. Dis.* **173**, 684-690.
- Arce, C. A., Rodriguez, J. A., Barra, H. S. & Caputo, R.** (1975). Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur. J. Biochem.* **59**, 145-149.
- Argarana, C. E., Barra, H. S. & Caputto, R.** (1978). Release of [<sup>14</sup>C]tyrosine from tubulinyl-[<sup>14</sup>C]tyrosine by brain extract. Separation of a carboxypeptidase from tubulin-tyrosine ligase. *Mol. Cell Biochem.* **19**, 17-21.
- Artymiuk, P. J., Poirrette, A. R., Rice, D. W. & Willett, P.** (1996). Biotin carboxylase comes into the fold. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 128-132.
- Arza, B., Felez, J., Lopez-Aleman, R., Miles, L. A. & Munoz-Canoves, P.** (1997). Identification of an epitope of alpha-enolase (a candidate plasminogen receptor) by phage display. *Thromb. Haemost.* **78**, 1097-1103.
- Austrian, R.** (1986). Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**, 35-45.
- Baldo, B. A. & Baker, R. S.** (1988). Inhalant allergies to fungi: reactions to bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and identification of bakers' yeast enolase as an important allergen. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **86**, 201-208.
- Barra, H. S., Arce, C. A., Rodriguez, J. A. & Caputto, R.** (1973). Uncorporation of phenylalanine as a single unit into rat brain protein: reciprocal inhibition by phenylalanine and tyrosine of their respective incorporations. *J. Neurochem.* **21**, 1241-1251.
- Bergen, L. G. & Borisy, G. G.** (1980). Head-to-tail polymerization of microtubules *in vitro*. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J. Cell. Biol.* **84**, 141-150.
- Bergmann, S** (2003). Identifizierung und Charakterisierung von Plasmin(ogen)-Bindungsproteinen von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, TU-Braunschweig.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S.** (2001). alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* **40**, 1273-1287.
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G. S. & Hammerschmidt, S.** (2003). Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **49**, 411-423.

- Broder, C.C., Lottenberg, R., Boyle, M.D.** (1989) Mapping of the human plasmin domain recognized by the unique plasmin receptor of group A streptococci. *Infect. Immun.* **57**, 2597-605.
- Brown, C. K., Kuhlman, P. L., Mattingly, S., Slates, K., Calie, P. J. & Farrar, W. W.** (1998). A model of the quaternary structure of enolases, based on structural and evolutionary analysis of the octameric enolase from *Bacillus subtilis*. *J. Protein Chem.* **17**, 855-866.
- Brünger, A.T.** (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nigles, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L.** (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. sec. D* **54**, 905-921.
- Burman, L.A., Norrby, R. & Trollfors, B.** (1985). Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev. Infect. Dis.* **7**, 133-142.
- Bürgin, J. & Schaller, J.** (1999). Expression, isolation and characterization of a mutated human plasminogen kringle 3 with a functional lysine binding site. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 135-141.
- Castellino, F. J. & Powell, J. R.** (1981). Human plasminogen. *Methods Enzymol.* **80**, 365-78.
- Chang, Y., Mochalkin, I., McCance, S. G., Cheng, B., Tulinsky, A. & Castellino, F. J.** (1998). Structure and ligand binding determinants of the recombinant kringle 5 domain of human plasminogen. *Biochemistry* **37**, 3258-3271.
- Cleveland, D. W. & Sullivan, K. F.** (1985). Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 331-365.
- Cooper, E. H.** (1994). Neuron-specific enolase. *Int. J. Biol. Markers* **9**, 205-10.
- Davies, D.R. & Segal, D.M.** (1971). Protein crystallization: Micro techniques involving vapour diffusion. *Methods Enzymol.* **22**, 253ff.
- Dideberg, O. & Bertrand, J.** (1998). Tubulin tyrosine ligase: a shared fold with the glutathione synthetase ADP-forming family. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 57-58.
- Downing, K. H. & Nogales, E.** (1998a). New insights into microtubule structure and function from the atomic model of tubulin. *Eur. Biophys. J.* **27**, 431-436.
- Downing, K. H. & Nogales, E.** (1998b). Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 785-791.
- Dubendorff, J. W. & Studier, F. W.** (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* **219**, 45-59.
- Ducruix, A. & Giegé, R., Eds.** (1992). Crystallization of nucleic acids and proteins: A practical approach. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Dudani, A.K., Cummings, C., Hashemi, S., Ganz, P.R.** (1993). Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells. *Thromb. Res.* **69**, 185-196.
- Eberhard, T., Kronvall, G. & Ullberg, M.** (1999). Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb. Pathog.* **26**, 175-181.

- Edde, B., Rossier, J., Le Caer, J. P., Prome, J. C., Desbruyeres, E., Gros, F. & Denoulet, P.** (1992). Polyglutamylated alpha-tubulin can enter the tyrosination/detyrosination cycle. *Biochemistry* **31**, 403-410.
- Ehinger, S.** (2000). Expression, Präparation, biochemische Charakterisierung und Kristallisation der Tubulin-Tyrosin Ligase. Diplomarbeit, TU Braunschweig
- Eiserich, J. P., Estevez, A. G., Bamberg, T. V., Ye, Y. Z., Chumley, P. H., Beckman, J. S. & Freeman, B. A.** (1999). Microtubule dysfunction by posttranslational nitrotyrosination of alpha-tubulin: a nitric oxide-dependent mechanism of cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 6365-6370.
- Elnakady, Y.A.** (2001). Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Disorazol, einem neuen antimotischen Stoff aus Myxobakterien. Dissertation, TU Braunschweig.
- Erck, C., Frank, R. & Wehland, J.** (2000). Tubulin-tyrosine ligase, a long-lasting enigma. *Neurochem. Res.* **25**, 5-10.
- Erickson, H.P.** (2000).  $\gamma$ -Tubulin nucleation: template or protofilament. *Nat. Cell Biol.* **2**, E93-96.
- Ersfeld, K., Wehland, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V. & Weber, K.** (1993). Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* **120**, 725-732.
- Esser, L., Wang, C. R., Hosaka, M., Smagula, C. S., Sudhof, T. C. & Deisenhofer, J.** (1998). Synapsin I is structurally similar to ATP-utilizing enzymes. *Embo J.* **17**, 977-984.
- Fagerstam, L. G., Frostell-Karlsson, A., Karlsson, R., Persson, B. & Ronnberg, I.** (1992). Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J. Chromatogr.* **597**, 397-410.
- Fan, C., Moews, P. C., Walsh, C. T. & Knox, J. R.** (1994). Vancomycin resistance: structure of D-alanine:D-alanine ligase at 2.3 Å resolution. *Science* **266**, 439-443.
- Finlay, B. B. & Falkow, S.** (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 136-169.
- Fox, D. & Smulian, A. G.** (2001). Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Med. Mycol.* **39**, 495-507.
- Galperin, M. Y. & Koonin, E. V.** (1997). A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Sci.* **6**, 2639-2643.
- Garman, E.F. & Schneider, T.R.** (1997). Macromolecular crystallography. *J. Appl. Cryst.* **30**, 211-237.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gundersen, G. G., Kalnoski, M. H. & Bulinski, J. C.** (1984). Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* **38**, 779-789.
- Gurland, G. & Gundersen, G. G.** (1995). Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **131**, 1275-1290.
- Hibi, T., Nishioka, T., Kato, H., Tanizawa, K., Fukui, T., Katsube, Y. & Oda, J.** (1996). Structure of the multifunctional loops in the nonclassical ATP-binding fold of glutathione synthetase. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 16-18.
- Highsmith RF, Kline DL.** (1971). Kidney: primary source of plasminogen after acute depletion in the

cat. *Science* **174**, 141-2.

**Hunte, C. & Michel, H.** (2002). Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 503-508.

**Hyams, J.S. & Lloyd, C.W.** (1993). Microtubules, Wiley-Liss, New York.

**Iida, H. & Yahara, I.** (1985). Yeast heat-shock protein of Mr 48.000 is an isoprotein of enolase. *Nature* **315**, 688-690.

**Ito, K., Ishiguro, A., Kanbe, T., Tanaka, K., Torii, S.** (1995). Characterization of IgE-binding epitopes on *Candida albicans* enolase. *Clin. Exp. Allergy* **25**, 529-535.

**Jancarik, J. & Kim, S.H.** (1991). Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411.

**Jeffery, C.J.** (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8-11.

**Jolodar, A., Fischer, P., Bergmann, S., Buttner, D.W., Hammerschmidt, S. & Brattig, N.W.** (2003). Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta* **1627**, 111-120.

**Jones, S. & Thornton, J.M.** (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13-20.

**Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard.** (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **47**, 110-119.

**Kalisz, H. M., Erck, C., Plessmann, U. & Wehland, J.** (2000). Incorporation of nitrotyrosine into alpha-tubulin by recombinant mammalian tubulin-tyrosine ligase. *Biochim. Biophys. Acta* **1481**, 131-138.

**Kato, K., Asai, R., Shimizu, A., Suzuki, F. & Ariyoshi, Y.** (1983). Immunoassay of three enolase isozymes in human serum and in blood cells. *Clin. Chim. Acta* **127**, 353-363.

**Khawaja, S., Gundersen, G. G. & Bulinski, J. C.** (1988). Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J. Cell Biol.* **106**, 141-149.

**Khyse-Anderson, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.

**Kissinger, C. R., Gehlhaar, D. K. & Fogel, D. B.** (1999). Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Crystallogr. sec. D* **55**, 484-491.

**Knudsen, B. S., Silverstein, R. L., Leung, L. L., Harpel, P. C. & Nachman, R. L.** (1986). Binding of plasminogen to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **261**, 10765-10771.

**Kreitzer, G., Liao, G. & Gundersen, G. G.** (1999). Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1105-1118.

**Kühnel, K. & Luisi, B. F.** (2001). Crystal structure of the *Escherichia coli* RNA degradosome component enolase. *J. Mol. Biol.* **313**, 583-592.

- Kumar, N & Flavin, M.** (1982). Modulation of some parameters of assembly of microtubules in vitro by tyrosinolation of tubulin. *Eur. J. Biochem.* **128**, 215-222.
- Lämmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lähteenmaki, K., Kuusela, P. & Korhonen, T. K.** (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 531-552.
- Lamzin, V.S. & Wilson, K.S.** (1993). Automated refinement of protein models. *Acta Crystallogr. sect. D* **49**, 129-147.
- Larsen, T. M., Wedekind, J. E., Rayment, I. & Reed, G. H.** (1996). A carboxylate oxygen of the substrate bridges the magnesium ions at the active site of enolase: structure of the yeast enzyme complexed with the equilibrium mixture of 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 4349-4358.
- Laskowski, R. A., Moss, D. S. & Thornton, J. M.** (1993). Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* **231**, 1049-1067.
- Lebioda, L. & Stec, B.** (1991). Mechanism of enolase: the crystal structure of enolase-Mg<sup>2+</sup>-2-phosphoglycerate/phosphoenolpyruvate complex at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* **30**, 2817-2822.
- Lebioda, L., Stec, B. & Brewer, J. M.** (1989). The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold beta + alpha-barrel with a novel beta beta alpha alpha (beta alpha)<sub>6</sub> topology. *J. Biol. Chem.* **264**, 3685-3693.
- Lerch, P. G. & Rickli, E. E.** (1980). Studies on the chemical nature of lysine-binding sites and on their localization in human plasminogen. *Biochim. Biophys. Acta* **625**, 374-378.
- Leslie, A.G.** (1992). Joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography, Daresbury Laboratory, Warrington, United Kingdom.
- Littauer, U. Z., Givon, D., Thierauf, M., Ginzburg, I. & Ponstingl, H.** (1986). Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**, 7162-7166.
- Little, M. & Seehaus, T.** (1988). Comparative analysis of tubulin sequences. *Comp. Biochem. Physiol. B* **90**, 655-670.
- Llinas, M., De Marco, A., Hochschwender, S.M., Laursen, R.A.** (1983). A <sup>1</sup>H-NMR study of isolated domains from human plasminogen. Structural homology between kringles 1 and 4. *Eur. J. Biochem.* **135**, 379-91.
- Loberts, S. & Correia, J.J.** (1991). Studies of crystallization conditions for native and subtilisin-cleaved pig brain tubulin. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 93-102.
- Lohman, K. & Meyerhof, O.** (1934). Über die enzymatische Umwandlung von Phosphoglyzerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure. *Biochem. Z.* **273**, 60-72.
- Lottenberg, R.** (1997). A novel approach to explore the role of plasminogen in bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol.* **5**, 466-467.
- Lottenberg, R., DesJardin, L. E., Wang, H. & Boyle, M. D.** (1992). Streptokinase-producing streptococci grown in human plasma acquire unregulated cell-associated plasmin activity. *J. Infect. Dis.* **166**, 436-440.

- Lottenberg, R., Minning-Wenz, D. & Boyle, M. D.** (1994). Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol.* **2**, 20-24.
- Luduena, R. F.** (1993). Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol. Biol. Cell* **4**, 445-457.
- Luduena, R.F.** (1998). Multiple isoforms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* **178**, 207-275.
- Machell, N. H., Fritz, L. & MacRae, T. H.** (1995). Interphase cells of the centric diatom, *Thalassiosira fluviatilis*, lack dephosphorylated, nontyrosinatable and acetylated tubulin. *Eur. J. Cell. Biol.* **67**, 50-56.
- MacRae, T. H.** (1997). Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur. J. Biochem.* **244**, 265-278.
- Mandelkow, E. M., Schultheiss, R., Rapp, R., Muller, M. & Mandelkow, E.** (1986). On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam, and handedness. *J. Cell Biol.* **102**, 1067-1073.
- Mansir, A. & Justine, J. L.** (1998). The microtubular system and posttranslationally modified tubulin during spermatogenesis in a parasitic nematode with amoeboid and a flagellate spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **49**, 150-167.
- Marshall, J. M., Brown, A. J. & Ponting, C. P.** (1994). Conformational studies of human plasminogen and plasminogen fragments: evidence for a novel third conformation of plasminogen. *Biochemistry* **33**, 3599-3606.
- Marti, D., Schaller, J., Ochensberger, B. & Rickli, E. E.** (1994). Expression, purification and characterization of the recombinant kringle 2 and kringle 3 domains of human plasminogen and analysis of their binding affinity for omega-aminocarboxylic acids. *Eur. J. Biochem.* **219**, 455-462.
- Mathews, I.I., Vanderhoff-Hanaver, P., Castellino F.J., Tulinsky, A.** (1996). Crystal structures of the recombinant kringle 1 domain of human plasminogen in complexes with the ligands epsilon-aminocaproic acid and trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic Acid. *Biochemistry* **35**, 2567-76.
- Matsuda, K., Mizuguchi, K., Nishioka, T., Kato, H., Go, N. & Oda, J.** (1996). Crystal structure of glutathione synthetase at optimal pH: domain architecture and structural similarity with other proteins. *Protein Eng.* **9**, 1083-1092.
- Matsuka, Y. V., Novokhatny, V. V. & Kudinov, S. A.** (1990). Fluorescence spectroscopic analysis of ligand binding to kringle 1 + 2 + 3 and kringle 1 fragments from human plasminogen. *Eur. J. Biochem.* **190**, 93-97.
- Matthews, B. W.** (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- McKean, P. G., Vaughan, S. & Gull, K.** (2001). The extended tubulin superfamily. *J. Cell Sci.* **114**, 2723-2733.
- McNeal, R.K. & Purich, D.L.** (1978). Stoichiometry and role of GTP hydrolysis in bovine neurotubule assembly. *J. Biol. Chem.* **253**, 4683-4687.
- McPherson, A.** (1999). Crystallization of Biologic Macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Merkulova, T., Lucas, M., Jabet, C., Lamande, N., Rouzeau, J.D., Gros, F., Lazar, M., Keller, A.** (1997). Biochemical characterization of the mouse muscle-specific enolase: developmental changes in electrophoretic variants and selective binding to other proteins. *Biochem. J.* **323**, 791-800.



- Miles, L. A., Dahlberg, C. M., Plescia, J., Felez, J., Kato, K. & Plow, E. F.** (1991). Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* **30**, 1682-1691.
- Mitchison, T. & Kirschner, M.** (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242.
- Molinari, G. & Cchatwal, G.S.** (1999). Stretococcal invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 56-61.
- Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M.** (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **12**, 345-364.
- Murofushi, H.** (1980). Purification and characterization of tubulin-tyrosine ligase from porcine brain. *J. Biochem. (Tokyo)* **87**, 979-984.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.H.** (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. sect. D* **53**, 240-255.
- Musher, D. M.** (1992). Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 801-807.
- Nakijama, K., Hamanoue, M., Takemoto, N., Hattori, T., Kato, K. Kohsaka, S.** (1994). Plasminogen binds specifically to a alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *J. Neurochem.* **63**, 2048-2057.
- Navarre, W. W. & Schneewind, O.** (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 174-229.
- Niklinski, J. & Furman, M.** (1995). Clinical tumour markers in lung cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* **4**, 129-138.
- Nogales, E.** (1999). A structural view of microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 133-142.
- Nogales, E.** (2001). Structural insight into microtubule function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 397-420.
- Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H.** (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199-203.
- Oakley, C. E. & Oakley, B. R.** (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662-664.
- Otwinowski, Z.** (1993). Oscillation data reduction program. In: Sawyer L., Isaacs N., Bailey S. (Eds.). *Data collection and processing, proceedings of the CCP4 study weekend. SERC Daresbury Laboratory, Warrington, UK*, 56-62.
- Otwinowski, Z. & Minor, W.** (1997). Processing x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-325.
- Pancholi, V.** (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 902-920.
- Pancholi, V. & Fischetti, V. A.** (1997). A novel plasminogen/plasmin binding protein on the surface of group A streptococci. *Adv. Exp. Med. Biol.* **418**, 597-599.
- Pancholi, V. & Fischetti, V. A.** (1998). alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J. Biol. Chem.* **273**, 14503-14515.

- Papp, O.** (2000). Funktionsanalyse von Mutanten der Tubulin-Tyrosin Ligase aus Schweinehirn nach gezielter PCR-Mutagenese. Projektarbeit, GBF Braunschweig.
- Paturle, L., Wehland, J., Margolis, R. L. & Job, D.** (1989). Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry* **28**, 2698-2704.
- Paturle-Lafanechere, L., Edde, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J. P., Wehland, J. & Job, D.** (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* **30**, 10523-10528.
- Petros, A. M., Ramesh, V. & Llinas, M.** (1989). <sup>1</sup>H NMR studies of aliphatic ligand binding to human plasminogen kringle 4. *Biochemistry* **28**, 1368-1376.
- Plow, E. F., Felez, J. & Miles, L. A.** (1991). Cellular regulation of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* **66**(1), 32-36.
- Plow, E. F., Freaney, D. E., Plescia, J. & Miles, L. A.** (1986). The plasminogen system and cell surfaces: evidence for plasminogen and urokinase receptors on the same cell type. *J. Cell Biol.* **103**, 2411-2420.
- Plow, E. F., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L. A. & Hoover-Plow, J. L.** (1995). The cell biology of the plasminogen system. *Faseb J.* **9**, 939-945.
- Ponting, C. P., Holland, S. K., Cederholm-Williams, S. A., Marshall, J. M., Brown, A. J., Spraggon, G. & Blake, C. C.** (1992). The compact domain conformation of human Glu-plasminogen in solution. *Biochim. Biophys. Acta* **1159**, 155-161.
- Pratesi, F., Moscato, S., Sabbatini, A., Chimenti, D., Bombardieri, S. & Migliorini, P.** (2000). Autoantibodies specific for  $\alpha$ -enolase in systemic autoimmune disorders. *J. Rheumatol.* **27**, 109-115.
- Preissner, K.T. & Cchatwal, G.S.** (1999). Extracellular matrix (ECM) and host cell surfaces: Potential sites of pathogen interaction. In: Cellular microbiology, Cossar, P. (eds.), ASM Press, Washington DC, pp.49-65.
- Preston, S. F., Deanin, G. G., Hanson, R. K. & Gordon, M. W.** (1979). The phylogenetic distribution of tubulin:tyrosine ligase. *J. Mol. Evol.* **13**, 233-244.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V.** (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**, 283-438.
- Rattner, J. B., Martin, L., Waisman, D. M., Johnstone, S. A. & Fritzler, M. J.** (1991). Autoantibodies to the centrosome (centriole) react with determinants present in the glycolytic enzyme enolase. *J. Immunol.* **146**, 2341-2344.
- Raybin, D. & Flavin, M.** (1977). Modification of tubulin by tyrosylation in cells and extracts and its effect on assembly in vitro. *J. Cell Biol.* **73**, 492-504.
- Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J. M., Le Caer, J. P., Rossier, J., Adoutte, A. & Bre, M. H.** (1994). Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* **266**, 1688-1691.
- Redlitz, A., Fowler, B. J., Plow, E. F. & Miles, L. A.** (1995). The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur. J. Biochem.* **227**, 407-415.
- Redlitz, A. & Plow, E. F.** (1995). Receptors for plasminogen and t-PA: an update. *Baillieres Clin.Haematol.* **8**, 313-327.

- Reed, G. H., Poyner, R. R., Larsen, T. M., Wedekind, J. E. & Rayment, I.** (1996). Structural and mechanistic studies of enolase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 736-743.
- Rehm, T., Huber, R. & Holak, T.A.** (2002). Applikation of NMR in Structural proteomics: Screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure* **10**, 1613-1618.
- Rejante, M. R., Byeon, I. J. & Llinas, M.** (1991). Ligand specificity of human plasminogen kringle 4. *Biochemistry* **30**, 11081-11092.
- Ring, A & Tuomanen, E.** (2000). Host cell invasion by *Streptococcus pneumoniae*. in Subcellular Biochemistry, **33**, Bacterial Invasion into Eukaryotic cells, Ölschläger & Haker. Kluwer Academic/Plenum Press, New York.
- Rodriguez, J. A., Arce, C. A., Barra, H. S. & Caputto, R.** (1973). Release of tyrosine incorporated as a single unit into rat brain protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 335-340.
- Rosenbaum, J.** (2000). Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr. Biol.* **10**, R801-803.
- Rossmann, M.G. & Blow, D.M.** (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr. sect. A* **15**, 24-31.
- Royds, J. A., Parsons, M. A., Taylor, C. B. & Timperley, W. R.** (1982). Enolase isoenzyme distribution in the human brain and its tumours. *J. Pathol.* **137**, 37-49.
- Rüdiger, M.** (1994). Posttranslationale Modifikationen im carboxyterminalen Bereich des Tubulins aus Schweinehirn und Vogelerthrozyten und Untersuchungen zur Substratspezifität der Tubulin-Tyrosin Ligase. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Rüdiger, M., Wehland, J. & Weber, K.** (1994). The carboxy-terminal peptide of detyrosinated alpha tubulin provides a minimal system to study the substrate specificity of tubulin-tyrosine ligase. *Eur. J. Biochem.* **220**, 309-320.
- Saksela, O. & Rifkin, D. B.** (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**, 93-126.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Press, USA.
- Sander, C. & Schneider, R.** (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* **9**, 56-68.
- Sasse, R. & Gull, K.** (1988). Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell. Sci.* **90**, 577-589.
- Schneider, A., Plessmann, U., Felleisen, R. & Weber, K.** (1998). Posttranslational modifications of trichomonad tubulins; identification of multiple glutamylation sites. *FEBS Lett.* **429**, 399-402.
- Schönbrunn, E., Phlippen, W., Trinczek, B., Sack, S., Eschenburg, S., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E.** (1999) Crystallization of a macromolecular ring assembly of tubulin liganded with the anti-mitotic drug podophyllotoxin. *J Struct Biol.* **128**, 211-5.
- Schröder, H. C., Wehland, J. & Weber, K.** (1985). Purification of brain tubulin-tyrosine ligase by biochemical and immunological methods. *J. Cell. Biol.* **100**, 276-281.

- Schurig, H., Rutkat, K., Rachel, R. & Jaenicke, R.** (1995). Octameric enolase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: purification, characterization, and image processing. *Protein Sci.* **4**, 228-236.
- Sha, J., Galindo, C. L., Pancholi, V., Popov, V. L., Zhao, Y., Houston, C. W. & Chopra, A. K.** (2003). Differential expression of the enolase gene under in vivo versus in vitro growth conditions of *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* **34**, 195-204.
- Shepard SR, Boucher R, Johnston J, Boerner R, Koch G, Madsen JW, Grella D, Sim BK, Schrimsher JL.** (2000) Large-scale purification of recombinant human angiostatin. *Protein Expr. Purif.* **20**, 216-27.
- Silin, V. & Plant, A.** (1997). Biotechnological applications of surface plasmon resonance. *TIBTECH* **15**, 353-359.
- Sloboda, R.L. & Rosenbaum, J.L.** (1982). Purification and assay of microtubule-associated proteins (MAPs). *Methods Enzymol.* **85**, 409-16.
- Smith, D. B. & Johnson, K. S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Söhdnel, S., Hu, C. K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinas, M. & Rickli, E. E.** (1996). Recombinant gene expression and <sup>1</sup>H NMR characteristics of the kringle (2 + 3) supermodule: spectroscopic/functional individuality of plasminogen kringle domains. *Biochemistry* **35**, 2357-2364.
- Sottrup-Jensen, L., Claeys, H., Zajdel, M., Petersen, T.E. & Magnusson, S.** (1978). in Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis (Davidson, J.F. Rowan, R.M., Samama, M.M. & Desnoyes, P.C. eds.) pp. 191-209, Raven Press, New York.
- Subramanian A. & Miller D.M.** (2000) Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J.Biol.Chem.* **275**, 5958-65.
- Thewes, T., Constantine, K., Byeon, I. J. & Llinas, M.** (1990). Ligand interactions with the kringle 5 domain of plasminogen. A study by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **265**, 3906-3915.
- Thorsen, S.** (1975). Differences in the binding to fibrin of native plasminogen and plasminogen modified by proteolytic degradation. Influence of omega-aminocarboxylic acids. *Biochim. Biophys. Acta* **393**, 55-65.
- Tong, L. & Rossmann, M. G.** (1997). Rotation function calculations with GLRF program. *Methods Enzymol.* **276**, 594-611.
- Tulinsky, A.** (1991). The structures of domains of blood proteins. *Thromb. Haemost.* **66**, 16-31.
- Tuomanen, E. I. & Masure, H. R.** (1997). Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Microb. Drug Resist.* **3**, 297-308.
- Van den Steen, P.E., Opdenakker, G., Wormald, M.R., Dwek, R.A. & Rudd, P.M.** (2001). Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1528**, 61-73.
- Varadi, A. & Patthy, L.** (1981). Kringle 5 of human plasminogen carries a benzamidine-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**, 97-102.
- Vriend, G.** (1990). WHAT IF: a molecular modelling and drug design program. *J. Mol. Graph.* **8**, 52-56.

- Weber, P.C.** (1997). Overview of protein crystallization methods: Macromolecular crystallography. *Methods Enzymol.* **276**, 13ff.
- Webster, D. R., Wehland, J., Weber, K. & Borisy, G. G.** (1990). Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J. Cell. Biol.* **111**, 113-122.
- Wedekind, J. E., Reed, G. H. & Rayment, I.** (1995). Octahedral coordination at the High-Affinity Metal Site in Enolase: Crystallographic Analysis of the MgII-Enzyme Complex from Yeast at 1.9 Å Resolution. *Biochemistry* **34**, 4325-4330.
- Wehland, J., Schröder, M. & Weber, K.** (1984). Organization of microtubules in stabilized meristematic plant cells revealed by a rat monoclonal antibody reacting only with the tyrosinated form of alpha-tubulin. *Cell. Biol. Int. Rep.* **8**, 147-150.
- Wehland, J. & Weber, K.** (1987a). Tubulin-tyrosine ligase has a binding site on beta-tubulin: a two-domain structure of the enzyme. *J. Cell Biol.* **104**, 1059-1067.
- Wehland, J. & Weber, K.** (1987b). Turnover of the carboxy-terminal tyrosine of alpha-tubulin and means of reaching elevated levels of detyrosination in living cells. *J. Cell Sci.* **88**, 185-203.
- Westermann, S. & Weber, K.** (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 938-947.
- Winram, S. B. & Lottenberg, R.** (1996). The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology* **142**, 2311-2320.
- Wolff, A., Denoulet, P. & Jeantet, C.** (1982). High level of tubulin microheterogeneity in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* **31**, 323-328.
- Wolodko, W. T., Fraser, M. E., James, M. N. & Bridger, W. A.** (1994). The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **269**, 10883-10890.
- Wu, T.P., Padmanabhan, K., Tulinsky, A., Mulichak, A.M.** (1991). The refined structure of the epsilon-aminocaproic acid complex of human plasminogen kringle 4. *Biochemistry* **30**, 10589-94.
- Xia, L., Hai, B., Gao, Y., Burnette, D., Thazhath, R., Duan, J., Bre, M. H., Levilliers, N., Gorovsky, M. A. & Gaertig, J.** (2000). Polyglycylation of tubulin is essential and affects cell motility and division in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell. Biol.* **149**, 1097-1106.
- Yamaguchi, H., Kato, H., Hata, Y., Nishioka, T., Kimura, A., Oda, J. & Katsube, Y.** (1993). Three-dimensional structure of the glutathione synthetase from *Escherichia coli* B at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **229**, 1083-1100.
- Zhang, E., Brewer, J. M., Minor, W., Carreira, L. A. & Lebioda, L.** (1997). Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* **36**, 12526-12534.

## 7. Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Dirk Heinz für die beiden interessanten Themen meiner Promotionsarbeit und die damit verbundene hervorragende Betreuung und die immer wieder aufmunternde Unterstützung, wenn ich mit meinem Latein mal wieder am Ende war. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Gruppe haben entscheidend zum Gelingen der Dissertation beigetragen.

Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch danke ich ihrem Interesse an meiner Arbeit und für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Ralf Mendel danke ich für die Teilnahme an der Prüfungskommission.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Urbanke danke ich für die Durchführung von Bindungsanalysen mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation.

Dr. Ronald Frank gilt mein Dank für die Herstellung der Peptide.

Dr. Laurence Paturle-Lafanechere danke ich für die Einweihung in der Geheimnisse der Tubulin-Reinigung.

Bei Rita Getzlaff möchte ich mich für die nette Aufnahme und Atmosphäre in ihrem Büro und die Übernahme der N-terminalen Sequenzanalyse bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Ute Widow und Dr. Joop van den Heuvel für die praktische Unterstützung und wertvollen Tips in den letzten Monaten dieser Arbeit.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an Dr. Wolf-Dieter Schubert, der mich in die Geheimnisse der Röntgenkristallographie eingeweiht hat, der mir unermüdlich immer wieder bei der Lösung der Struktur geholfen hat und mir immer und immer wieder die Computerprogramme erklärt hat, die die Röntgenstrukturanalyse erheblich erleichtern. Vielen Dank für das tolle Engagement und die vielen hilfreichen Diskussionen!

Den Mitgliedern der Abteilung Strukturbioogie danke ich herzlich für das prima Arbeitsklima, die unzähligen Hilfestellungen und die vielen fachkundigen, motivierenden und auch lustigen Diskussionen im Labor und im Büro: Isa Astner, Maike Bublitz, Carina Büttner, Guido Diederich, Antje Findeis, Susanne Frese, Stephanie Gläserer, Gregor Hagelüken, Joop van den Heuvel, Marina Lindemann, Hartmut Niemann, Joachim Reichelt Wolf-Dieter Schubert, Jörg Schulze, Bernd Voedisch, Sabine Weißflog und Ute Widow.

Meinen Freunden in Braunschweig und Umgebung: Patricia Winnicki, Peter Willim, Familie Wenderoth, Andrea und Frank Jenzora, danke besonders für die vielen Ablenkungsmanöver und liebevolle Unterstützung außerhalb der GBF-Mauern. Ohne euch hätte ich das nicht gepackt!

Den beiden Neu-Amerikanern Matthias Machner und Melanie Barzik, Viola Beier und Frederic Frère danke ich für den unendlichen Spaß, den wir im Labor, im Büro und außerhalb der GBF miteinander hatten.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester Julia möchte ich mich besonders herzlich für die wertvolle Entlastung und Ablenkung außerhalb der GBF, sowie den niemals nachlassenden persönlichen und auch finanziellen Beistand danken. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

Vielen Dank, Martin, dass Du immer an mich glaubst und immer für mich da bist. Mir fehlen die Worte. Ich bin froh, dass es Dich jetzt in meinem Leben gibt!